

Bárbara Pacheco Harrison Righetti

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES E SUA  
RELAÇÃO COM CONTAMINANTES ORGÂNICOS EM  
BOTOS-DA-TAINHA (*Tursiops truncatus*) RESIDENTES NO SUL  
DO BRASIL**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
mestre em Bioquímica  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Karim Hahn  
Lüchmann  
Coorientador: Prof. Dr. Afonso C. D.  
Bainy

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

RIGHETTI, BÁRBARA PACHECO HARRISON  
RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES E SUA  
RELAÇÃO COM CONTAMINANTES ORGÂNICOS EM BOTOS-DA  
TAINHA (*Tursiops truncatus*) RESIDENTES NO SUL DO  
BRASIL / BÁRBARA PACHECO HARRISON RIGHETTI ;  
orientadora, KARIM HAHN LÜCHMANN, coorientador,  
AFONSO C.D. BAINY, 2017.  
128 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis,  
2017.

Inclui referências.

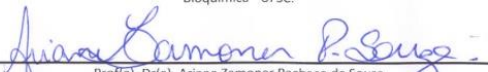
1. Bioquímica. 2. ECOTOXICOLOGIA. 3. CETÁCEOS. 4.  
CONTAMINANTES ORGÂNICOS. 5. BIOMARCADORES  
BIOQUÍMICOS E MOLECULARES. I. LÜCHMANN, KARIM HAHN.  
II. BAINY, AFONSO C.D.. III. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. IV. Título.

**"Respostas bioquímicas e moleculares e sua relação com contaminantes orgânicos em botos-da-tainha (Tursiops truncatus) residentes no sul do Brasil"**

Por

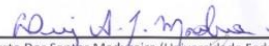
**Barbara Pacheco Harrison Righetti**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (15/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

  
Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:

  
Dr(a) Karim Hahn Luchmann (Universidade do Estado de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
Dr(a) Luiz Augusto Dos Santos Madureira (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr(a) Maria Risoleta Freire Marques (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr(a) Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 28 de março de 2017.



Dedico este trabalho aos botos,  
motivadores das perguntas e da  
persistência em encontrar as respostas,  
às vezes tão evasivas...



## AGRADECIMENTOS

Este trabalho certamente não poderia ter sido realizado sem a ajuda direta ou indireta de muitas pessoas.

Primeiramente, gostaria de agradecer minha orientadora, Karim, por ter topado essa empreitada sabendo das diversas dificuldades que adviriam, por ter colaborado imensamente em todas as etapas e pelo bom humor sempre.

Ao meu co-orientador, professor Afonso Bainy, por ter aberto as portas do LABCAI para um projeto consideravelmente diferente e pelas colaborações e sugestões ao longo do caminho.

Ao querido Paulinho, por possibilitar que eu começasse e permanecesse trabalhando com esta nossa mastofauna cativante. Ao Fábio, por toda a ajuda nas coletas, muitas vezes frustrantes, e pelos conselhos estatísticos valiosíssimos.

À Carol, Rodrigo e Pedro, pela ajuda nas coletas e pela companhia nas saídas de campo.

À Macarena, pela ajuda na construção dos mapas.

A toda a equipe do LABQOM, em especial à Satie e à Josilene, por terem me recebido, e pacientemente me acompanhado nas análises de contaminantes orgânicos.

A equipe do LABCAI, em especial ao Jacó, Lila, Daína e Flávia por terem me ensinado/ajudado esses dois anos a compreender o mundo dos biomarcadores, que ainda era um total enigma no início desse mestrado.

Aos meus pais, amados, que por alguma razão compreendem o meu trabalho e acham ele tão lindo quanto eu acho.

E aos meus amigos queridos, por tornarem momentos difíceis mais fáceis, e momentos fáceis ainda mais deliciosos.

Por fim, aos órgãos fomentadores financeiros, CAPES, FAPESC e Society for Marine Mammalogy, que possibilitaram a realização do trabalho.





## RESUMO

A intensificação de atividades industriais e agrícolas na margem de corpos d'água tem imposto aos ambientes aquáticos uma crescente carga de resíduos. Dentre esses, poluentes orgânicos persistentes (POPs) e metais-traço, os quais se concentram no ambiente e nos organismos em decorrência de sua difícil degradação. POPs são biomagnificados através da dieta, alcançando níveis elevados em tecidos adiposos de predadores de topo, como cetáceos. POPs são frequentemente relacionados à maior incidência de doenças oportunistas e de carcinomas e à diminuição das taxas reprodutivas em cetáceos. Faz-se necessário o emprego de biomarcadores que permitam identificar antecipadamente quadros de exposição a tais compostos. O presente trabalho mensurou biomarcadores de biotransformação de xenobióticos, do sistema de defesa antioxidante e defesa imunológica em amostras tegumentares de botos da tainha, residentes no Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, SC (CEL), e no estuário da Lagoa dos Patos, RS (ELP). Valores de contaminantes bioacumulados e resposta de biomarcadores foram comparados entre locais, machos e fêmeas, adultos e juvenis e entre botos amostrados no inverno e no verão. Níveis de resposta de biomarcadores também foram correlacionados aos níveis de organoclorados (OCs), bifenilas policloradas (PCBs) e éteres difenílicos polibromados (PBDEs) bioacumulados. Botos de CEL e ELP apresentaram padrão de PCBs e pesticidas similares. Botos de CEL apresentaram valores médios de  $\sum \text{DDTs} / \sum \text{PCBs}$  significativamente maiores que os animais de ELP, e correlação negativa ( $r = -0,57$ ) entre a o tamanho da área de concentração de vida e  $\sum \text{POPs}$  bioacumulados. No ELP, os botos apresentaram concentrações mais elevadas de Mirex e PCBs. Dentre os biomarcadores avaliados, níveis de transcrição de metalotioneína 2A (*MT2*) foram significativamente mais elevados em botos de CEL. Local não exerceu influência significativa sobre níveis de resposta dos demais biomarcadores. Além do local, estação de coleta e sexo influenciaram significativamente concentrações de POPs bioacumulados e níveis de resposta de biomarcadores. Concentração de PCBs, DDTs e hexaclorobenzeno (HCB) foram menores em botos amostrados no inverno. Similarmente, atividade glutatona-S-transferase (GST) foi menor em botos amostrados no inverno. Variação sazonal também foi observada para níveis de transcrição de interleucina 1 (*IL1*), glutatona redutase (*GR*), glutatona peroxidase (*GPx*), gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase (*GAPDH*), beta-actina (*B-ACT*), receptor aril de hidrocarboneto (*AHR*) e glutathiona-S-transferase, isoforma pi (*GST-pi*), com valores mais elevados de transcrição em botos amostrados no inverno. Em relação ao sexo, concentração de PCBs, DDTs e Mirex foram significativamente maiores em machos. O número de transcritos do complexo principal de histocompatibilidade classe II (*MHCII*) e beta-actina (*B-ACT*) também foram significativamente maiores em machos. As atividades superóxido dismutase (*SOD*), GPx e GR não variaram de acordo com local, sexo, faixa etária ou estação de coleta. Apesar de não terem sido obtidos valores de correlação significativos entre as classes de POPs e os níveis de resposta de biomarcadores, a análise de componentes principais (PCA) permite observar variação similar entre PBDEs, PCBs, Mirex e HCB e atividade GST, *SOD* e, em menor grau, atividade GPx. Resultados da PCA também indicam variação similar entre DDTs e níveis de transcritos de *ARNT* e, em menor grau, atividade GR. Atividade EROD e catalase ficaram abaixo do limite de detecção, assim como níveis de transcrição de *CYP1A*, interleucina-2 (*IL-2*) e interferon gama (*IFN-g*) ficaram abaixo do limite de detecção. Portanto, tais biomarcadores não foram incluídos em análises subsequentes. Os resultados indicam que níveis de POPs mensurados estão abaixo de valores críticos obtidos em áreas extremamente poluídas e reforçam o papel do Rio Tubarão como fonte de POPs para CEL. A análise de biomarcadores reflete os níveis de contaminação dos botos, apresentando variação também moderada entre as amostras. Níveis de transcrição de *MT2*, no entanto, indicam maior contaminação por metais-traço em CEL, embora tais elementos não tenham sido mensurados no presente trabalho. Os dados obtidos reforçam o potencial de uso dos níveis de transcrição de *ARNT* bem como atividade de GST como biomarcadores de exposição a POPs. Níveis de transcrição de *MHCII* sugerem maior resposta imune em botos com maiores níveis de POPs bioacumulados, possivelmente decorrente de uma maior exposição destes animais a patógenos. Por fim, nossos resultados enfatizam a necessidade de levar em conta a variação sazonal e de sexo quando da realização de estudos de biomonitoramento em cetáceos.

**Palavras-chave:** Boto-da-tainha, complexo estuarino de laguna, lagoa dos patos, organoclorados, biomarcadores, biotransformação, enzimas antioxidantes.

## ABSTRACT

Intensified industrial and agricultural development around waters bodies imposes upon aquatic environments an increasing load of chemical residues. Among these, persistent organic pollutants (POPs) and trace metals that accumulate on the environment and its organisms due to its resistance to degradation. POPs are biomagnified through diet, reaching high levels in adipose tissue of top predator, such as cetaceans. POPs are frequently associated to higher occurrence of opportunistic diseases, genetic alterations and diminishing reproductive rates on cetaceans. As such, is necessary to use biomarkers that indicate early-on exposure to POPs. The present study measured biomarkers of xenobiotic biotransformation, antioxidant defense system and immune response in integument tissue of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) resident to the estuarine complex of Santo Antonio dos anjos-Imaruí-Mirim, SC (CEL) and to Patos lagoon estuary, RS (ELP). Contamination levels and biomarkers response values were compared between locations, males and females, adults and juveniles and dolphins sampled in the summer or winter. Biomarkers response values were also correlated to levels of bioaccumulated organochlorine pesticides, polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). Dolphins from CEL and ELP present a similar PCB congeners and pesticides pattern. CEL dolphins showed significantly higher  $\sum\text{DDTs}/\sum\text{PCBs}$  values than ELP dolphins, and present a negative correlation ( $r = -0.57$ ) between concentration area and  $\sum\text{POPs}$  bioaccumulated. For ELP, dolphins showed higher Mirex and PCBs levels. Among analyzed biomarkers, transcription levels of metallothionein 2A (*MT2*) were significantly higher in dolphins from CEL. Location did not influence significantly other biomarkers. Besides location, sampling season and gender influenced significantly the concentration of POPs bioaccumulated and biomarkers response. PCBs, DDTs and hexachlorobenzene (HCB) levels were significantly lower in dolphins sampled in the winter. Similarly, glutathione-S-transferase (GST) activity was lower in dolphins sampled in the winter. Seasonal variation was also observed for transcription levels of interleukin-1 (*IL-1*), glutathione reductase (*GR*), glutathione peroxidase (*GPx*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), beta-actin (*B-ACT*), aryl hydrocarbon receptor (*AHR*) and glutathione-S-transferase pi (*GST-pi*), with significantly higher values in samples obtained in the winter. Regarding gender, PCBs, DDTs and Mirex levels were significantly higher in

males. Transcription levels of major histocompatibility complex class II (*MHCII*) and beta-actin (*B-ACT*) were also significantly higher in males. Superoxide dismutase (SOD), GPx and GR activity did not vary significantly with location, gender or sampling season. Despite the absence of significant correlation values between POPs classes and biomarkers response, principal component analysis (PCA) exhibits similar variation patterns among PBDEs, PCBs, Mirex and HCB and GST, SOD and GPx activity. PCA results also indicate similar variation pattern between DDTs and *ARNT* transcription levels and, to a minor extent, GR activity. EROD and catalase activity remained below detection limit, as did the transcription levels of *CYP1A*, interleukin-2 (*IL-2*) and interferon-gamma (*IFN-g*). As such, these biomarkers were excluded from further analysis. Results indicate that measured POPs levels are moderate, below critical values obtained in highly polluted areas and reinforce the role of Tubarao River as a main source of POPs to CEL. Biomarkers response reflected POPs levels and showed moderate variation between samples. However, results indicated a possibly higher contamination of CEL by trace metals and support the usage of *ARNT* and GST activity as biomarkers to POPs exposure. Also, *MHCII* transcription rates suggested an increased immune response in contaminated animals, possibly due to a higher exposure to pathogens. Finally, our results emphasize the need to consider seasonal variability upon using molecular biomarkers in cetaceans biomonitoring studies.

**Keywords:** Bottlenose dolphin, Laguna estuarine system, Patos lagoon estuary, organochlorines, biomarkers, biotransformation, antioxidant enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Resumo esquemático das fases I, II e III do sistema de biotransformação de xenobióticos em uma célula, apresentando como exemplo a detoxificação do benzo[a]pireno (BaP), um hidrocarboneto policíclico aromático (R.E.: Retículo Endoplasmático; CYP1A/CY2B: Citocromos P450; GST: Glutathione-S-transferase; GSH: Glutathione Reduzida; GSSG: Glutathione dissulfídica).....	5
<b>Figura 2:</b> Sistema de defesa antioxidante, evidenciando neutralização de EROS como $H_2O_2$ , $\cdot OH$ , $O_2^-$ e peróxidos lipídicos (Lipid-OOH) por enzimas antioxidantes (CAT: Catalase, SOD: Superóxido dismutase; GST: glutathione S-transferase, GR: Glutathione redutase, GPx: Glutathione peroxidase). Co-fatores, enzimas auxiliares e intermediários de reações também representados. GSSG: Glutathione dissulfídica, GSH: Glutathione reduzida, G6PDH: Glicose-6-fosfato desidrogenase, NADP: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado, NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (Adaptado de Regoli, 2011). .....	7
<b>Figura 3:</b> Ativação do sistema AHR/ARNT por benzo- <i>a</i> -pireno (BaP). Ativação de AHR, formação do complexo AHR/ARNT, reconhecimento por regiões genômicas denominadas elementos responsivos a xenobióticos (XREs) e ativação da transcrição de genes de enzimas de fase I e fase II de biotransformação. (Adaptado de ARENAS-HUERTERO et al., 2011). .....	9
<b>Figura 4:</b> Localização e ampliação das duas áreas de amostragem. A: Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, sul de Santa Catarina (SC) (CEL), e B: Estuário da Lagoa dos Patos (ELP), extremo sul do Rio Grande do Sul (RS).....	19
<b>Figura 5:</b> Fracionamento do material tegumentar de boto-da-tainha, coletado através de biópsia remota, em uma fração epidérmica e uma fração adiposa.....	21
<b>Figura 6:</b> Fluxograma do processamento de amostras lipídicas e obtenção de eluato para quantificação de poluentes orgânicos através da realização de cromatografia gasosa acoplado a detector de elétrons (GC-ECD) ou espectrômetro de massas (GC-MS).....	26
<b>Figura 7:</b> Perfil de congêneros de PCBs quantificados em amostras tegumentares de <i>T. truncatus</i> do Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/SC (CEL) (A) e do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande/RS (ELP) (B). Concentração em ng/g lipídeos. 40	

**Figura 8:** Perfil de pesticidas bioacumulados em *T. truncatus* do Complexo Estuarino Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/SC (CEL) e do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande/RS (ELP). Concentração total de pesticidas, em ng g lipídeos<sup>-1</sup>, calculada a partir dos valores totais de todas as amostras de cada local (CEL - n = 7; ELP - n = 10). ..... 41

**Figura 9:** Boxplot evidenciando mediana e intervalo interquartilístico da razão  $\sum DDTs / \sum PCBs$  para indivíduos amostrados na população do CEL e do ELP. \*\*\*p<0,001. Entalhes indicam intervalo de confiança (95%), e dados discrepantes são identificados como pontos externos às hastes. .... 43

**Figura 10:** Gráfico evidenciando a correlação entre valores de POPs totais bioacumulados (em ng g lipídeos<sup>-1</sup>) e área de concentração (Kernel 50%) em km<sup>2</sup>, para indivíduos amostrados no Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/ SC (CEL). ..... 45

**Figura 11:** Mapas de área de concentração (Kernel 50%) dos indivíduos do Complexo Estuarino Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/SC (CEL), ordenados de ‘A’ a ‘G’ em ordem crescente de concentração de POPs totais. A- LG4 (#46\*), B- LG5 (#48\*), C- LG2 (#142\*), D- LG1 (#3\*), E- LG6 (#32\*), F- LG3 (#16\*), G- LG7 (#51\*). \*: Códigos de identificação individual conforme catálogo de Foto-ID (DAURA-JORGE; INGRAM; SIMÕES-LOPES, 2013). ..... 46

**Figura 12:** Orientação das variáveis quantitativas (classes de contaminantes) (A) e variáveis categóricas (sexo, faixa etária, local e estação de coleta) (B) em relação aos eixos das dimensões 1 e 2 da FAMD. .... 49

**Figura 13:** Posicionamento dos indivíduos amostrados relativamente às dimensões 1 e 2 da FAMD, identificados com base no local (A), estação de coleta (B), sexo (C) e faixa etária (D). ..... 50

**Figura 14:** Boxplots da mediana de Glutathione S-Transferase (GST) (A), Superóxido Dismutase (SOD) (B), Glutathione Peroxidase (GPx) (C) e Glutathione Redutase (GR) (D) em botos amostrados no CEL e no ELP. Bigodes representam intervalo interquartilístico de 25 e 75% e entalhes indicam intervalo de confiança de 95%. Dados discrepantes identificados como pontos externos ao bigode. .... 52

**Figura 15:** Boxplots da mediana de Glutathione S-Transferase (GST) (A), Superóxido Dismutase (SOD) (B), Glutathione Peroxidase (GPx) (C) e Glutathione Redutase (GR) (D) em botos Adultos e Juvenis. Bigodes representam intervalo interquartilístico de 25 e 75% e entalhes indicam

intervalo de confiança de 95%. Dados discrepantes identificados como pontos externos ao bigode. ....	53
<b>Figura 16:</b> Boxplots da mediana de Glutathione <i>S</i> -Transferase (GST) (A), Superóxido Dismutase (SOD) (B), Glutathione Peroxidase (GPx) (C) e Glutathione Redutase (GR) (D) em botos Fêmeas e Machos. Bigodes representam intervalo interquartilico de 25 e 75% e entalhes indicam intervalo de confiança de 95%. Dados discrepantes identificados como pontos externos ao bigode. ....	54
<b>Figura 17:</b> Boxplots da mediana de Glutathione-S-Transferase (GST) (A), Superóxido Dismutase (SOD) (B), Glutathione Peroxidase (GPx) (C) e Glutathione Redutase (GR) (D) em botos amostrados no inverno e no verão. Bigodes representam intervalo interquartilico de 25 e 75% e entalhes indicam intervalo de confiança de 95%. Dados discrepantes identificados como pontos externos ao bigode. $\ast=p<0,05$ . ....	55
<b>Figura 18:</b> <i>Heat Map</i> retratando valores de correlação ('r' de Spearman) entre valores de atividade enzimática (GST, GPx, GR e SOD) e níveis de concentração das distintas classes de contaminantes orgânicos. $\ast p<0,05$ . Dendogramas representam similaridades entre valor médio de linhas (POPs) e colunas (enzimas). ....	57
<b>Figura 19:</b> Correlações ('r' de Spearman) entre atividade Glutathione peroxidase (GPx) ( $\text{mU.mg proteína}^{-1}$ ) e concentração de POPs totais ( $\text{ng g lipídeos}^{-1}$ ) (A), Glutathione Redutase (GR) ( $\text{mU.mg proteína}^{-1}$ ) e concentração de PBDEs ( $\text{ng g lipídeos}^{-1}$ ) (B) e atividade GST ( $\text{mU.mg proteína}^{-1}$ ) e a concentração de PBDEs ( $\text{ng g lipídeos}^{-1}$ ) (C). ....	58
<b>Figura 20:</b> Níveis de transcrição relativa de <i>AHR</i> , <i>ARNT</i> , <i>GPX</i> , <i>GR</i> , <i>GST-pi</i> , <i>IL1</i> , <i>MHCII</i> , <i>MT2</i> , <i>GAPDH</i> e <i>B-ACT</i> em tecido epidérmico de <i>T. truncatus</i> . Valores representados como mediana e intervalo interquartilico. Transcrição relativa ao grupo de CEL. $\ast p\leq 0,05$ . ....	60
<b>Figura 21:</b> Níveis de transcrição relativa de <i>AHR</i> , <i>ARNT</i> , <i>GPX</i> , <i>GR</i> , <i>GST-pi</i> , <i>IL1</i> , <i>MHCII</i> , <i>MT2</i> , <i>GAPDH</i> e <i>B-ACT</i> em tecido epidérmico de <i>T. truncatus</i> . Valores representados como mediana e intervalo interquartilico. Transcrição relativa ao grupo 'fêmeas'. $\ast p\leq 0,05$ . ....	61
<b>Figura 22:</b> Níveis de transcrição relativa de <i>AHR</i> , <i>ARNT</i> , <i>GPX</i> , <i>GR</i> , <i>GST-pi</i> , <i>IL1</i> , <i>MHCII</i> , <i>MT2</i> , <i>GAPDH</i> e <i>B-ACT</i> em tecido epidérmico de <i>T. truncatus</i> . Valores representados como mediana e intervalo interquartilico. Transcrição relativa ao grupo 'Adultos'. $\ast p\leq 0,05$ . ....	62
<b>Figura 23:</b> Níveis de transcrição relativa de <i>AHR</i> , <i>ARNT</i> , <i>GPX</i> , <i>GR</i> , <i>GST-pi</i> , <i>IL1</i> , <i>MHCII</i> , <i>MT2</i> , <i>GAPDH</i> e <i>B-ACT</i> em tecido epidérmico de <i>T. truncatus</i> . Valores representados como mediana e intervalo	

interquartilico. Transcrição relativa ao grupo ‘inverno’\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ . ..... 63

**Figura 24:** *Heat Map* construído com base nos valores de ‘ $r$  de Spearman’, indicando a correlação entre as distintas classes de contaminantes e os genes de interesse avaliados. Dendogramas representam similaridade entre valor médio de linhas (POPs) e colunas (genes). \* $p < 0,05$ ..... 64

**Figura 25:** Representação gráfica dos eixos 1 e 2 (PC1 e PC2) da análise de componentes principais (PCA), evidenciando o posicionamento de todas as variáveis e amostras em relação aos eixos. Indivíduos agrupados de acordo com sexo (machos e fêmeas), faixa etária (juvenil ou adulto) e estação do ano em que foram amostrados (verão e inverno). Elipses representam intervalo de confiança de 95% para variância populacional. .... 66

**Figura 26:** Representação gráfica dos eixos 1 e 2 (PC1 e PC2) da análise de componentes principais (PCA), evidenciando o posicionamento das variáveis representativas (PBDEs, DDTs, GST, *ARNT* e *GAPDH*) e amostras em relação aos eixos. Indivíduos agrupados de acordo com sexo (machos e fêmeas), faixa etária (juvenil ou adulto) e estação do ano em que foram amostrados (verão e inverno). Elipses representam intervalo de confiança de 95% para variância populacional..... 68



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resumo dos dados de amostragem para os indivíduos analisados no presente trabalho: N° da amostra, estabelecida de acordo com local e ordem de coleta, Identificação (ID) segundo catálogo de monitoramento das populações*, Sexo, Faixa Etária (Juvenil ou Adulto), Data e Coordenadas do local de amostragem.....	23
<b>Tabela 2:</b> Limites de Detecção do Método (LDM) para cromatografia a gás acoplada a detector de elétrons (GC-ECD) ou a espectrômetro de massas (GC-MS), em ng g de peso úmido <sup>-1</sup> , para PBDEs, pesticidas e PCBs, respectivamente.....	27
<b>Tabela 3:</b> Iniciadores utilizados para análise da biomarcadores moleculares. Detalhamento das suas sequências, conteúdo de guanina e citosina (%GC), temperatura de anelamento (TM), qualidade e eficiência dos iniciadores, bem como tamanho do amplicon gerado e cycle threshold (Ct) para cada gene avaliado.....	35
<b>Tabela 4:</b> Modelos lineares generalizados (GLMs) melhor ajustados para cada classe de POP, para os parâmetros: sexo (S), faixa etária (F), local (L) e estação de coleta (E). Dados incluem sumário do modelo, coeficientes para o nível 1 de cada parâmetro, valor de p [Pr(chi)] para cada parâmetro, calculado pelo teste de razão de verossimilhança (LRT), valor de AICc (Akaike Information Criteria), ΔAICc, indicando a diferença entre AICc de modelo melhor ajustado e o modelo ‘cheio’, com todas os parâmetros incluídos, peso AICc, desvio e NPar, que indica números de parâmetros utilizados. ....	44
<b>Tabela 5:</b> Total de Variância (Eigenvalues), porcentagem de variância individual e cumulativa dos dados explicadas pelos fatores (Dim.1-5) criadas pela FAMD com base nas variáveis categóricas e quantitativas. ....	47
<b>Tabela 6:</b> Coordenadas (Coord) e contribuições relativas (Ctr) de cada classe de contaminante às duas primeiras dimensões de FAMD. ....	48
<b>Tabela 7:</b> Coordenadas (Coord) e contribuições relativas (Ctr) de cada variável categórica às duas primeiras dimensões de FAMD.....	48
<b>Tabela 8:</b> Coeficientes de correlação (‘r’ de Spearman) entre níveis de classes de contaminantes e valores de atividade de glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glutathione reductase (GR). ....	56

<b>Tabela 9:</b> Valores de contribuição (Loadings) de cada variável para a construção dos eixos 1-4 (PC1-PC4) da Análise de Componentes Principais (PCA).....	65
<b>Tabela 10:</b> Valores de contribuição (Loadings) de cada variável para a construção dos eixos 1 e 2 (PC1-PC2) da segunda análise de componentes principais (PCA), construída com base apenas em cinco variáveis representativas (PBDEs, DDTs, GST, <i>ARNT</i> e <i>GAPDH</i> ).....	67
<b>Tabela 11:</b> Concentração média (ng g lípidos <sup>-1</sup> ) de $\Sigma$ PCBs, $\Sigma$ DDTs, Mirex, HCB, $\Sigma$ CHLs e $\Sigma$ PBDEs, em amostras lipídicas de distintas espécies de delfínídeos, obtidas através de necrópsia ou biópsia.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[ ]: Concentração

·OH: radical hidroxila

Abs: Absorbância

AHR: Receptor aril de hidrocarbonetos; do inglês aryl hydrocarbon receptor

ARNT: Translocador Nuclear de AHR; do inglês aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

B-ACT: Beta-Actina

BSA: Albumina do soro bovino; do inglês bovine serum albumin

CAT: Catalase

cDNA: DNA complementar

CDNB: 2,4- Dinitroclorobenzeno

CEL: Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/SC

Ct: Treshold cycle

CuOOH: Hidroperóxido de cumeno

CYP1A: Citocromo P450 da subfamília 1A

CYP450: Citocromo P450

DDE: Diclorodifenylldicloroetileno

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

df: graus de liberdade, do inglês degrees of freedom

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DTT: Ditiotreitól

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELP: Estuário da Lagoa dos Patos, Rio grande/RS

EROD: Etóxiressorufina-O-deetilase

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FAMD: Análise fatorial para dados mistos, do inglês Factorial Analysis for Mixed Data

FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês Food and Agriculture Organization

G6PDH: Glicose-6-fosfato desidrogenase

GC-ECD: Cromatografia a gás acoplada a detector de captura de elétrons

GC-MS: Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas

GLM: Modelos lineares generalizados, do inglês Generalized Linear Models

GR: Glutathione redutase  
GSH: Glutathione reduzida  
GSSG: Glutathione dissulfeto  
GST: Glutathione S-transferase  
GST-pi: Glutathione S-transferase isoforma pi  
H<sub>2</sub>O: água  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfúrico  
HCB: Hexaclorobenzeno  
HCHs: Hexaclorociclohexanos  
HCl: Ácido Clorídrico  
HPAS: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos  
HSPs: Proteínas de Choque térmico, do inglês Heat Shock Protein  
IAEA: Agência Internacional de Energia Atômica, do inglês International Atomic Energy Agency  
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis  
IL-1: Interleucina-1  
IOC: Comissão Oceanográfica Intergovernamental, do inglês Intergovernmental Oceanographic Commission  
LD: Limite de Detecção  
LDM: Limite de Detecção do Método  
LLD: Patologia similar a lobomycose, do inglês Lobomycosis Like Disease  
MHCII: Complexo principal de histocompatibilidade classe II, do inglês major histocompatibility complex, class II  
MT: Metalotioneína  
NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
ng: Nanogramas  
NK: Natural Killer  
nm: nanômetros  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Íon superóxido  
pb: pares de bases  
PBDES: Éteres difenílicos polibromados  
PCA: Análise de componentes principais  
PCBS: Bifenilas policloradas  
PCDDs: Dibenzodioxinas policloradas  
PCDFs: Dibenzofuranos policlorados  
PCR: Reação em cadeia da Polimerase, do inglês Polymerase Chain reaction  
PHAHS: Hidrocarbonetos Aromáticos Polihalogenados

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonil  
PNUMA: Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente  
POPs: Poluentes orgânicos persistentes  
qPCR: PCR quantitativa  
RPL4: Proteína ribossomal L4  
RPS18: Proteína ribossomal S18  
SDHA: Succinato Desidrogenase  
SDS: Sódio dodecil sulfato  
SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade  
SOD: Superóxido Dismutase  
SQRT: Raiz quadrada  
TCMX: Tetracloro-m-xileno  
UDP: Uridina difosfato  
UDPGT: UDP Glucuronosiltransferase  
UNEP: Agência das Nações Unidas do Meio Ambiente  
USOD: Unidades de SOD  
XREs: Elementos Responsivos a xenobióticos, do inglês Xenobiotic Response Elements



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS .....	1
1.2	METABOLISMO DE CONTAMINANTES ORGÂNICOS..	4
1.3	CETÁCEOS COMO ORGANISMOS SENTINELA .....	9
1.4	OS BIOMARCADORES EM CETÁCEOS .....	12
1.5	OBJETIVOS .....	16
<b>1.5.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
2.1	AMOSTRAGEM .....	19
2.2	PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS .....	20
2.3	FOTO-IDENTIFICAÇÃO (Foto-ID).....	21
2.4	SEXAGEM .....	21
2.5	ANÁLISE DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES .....	24
<b>2.5.1</b>	<b>Preparo da amostra .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Extração e concentração da amostra.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Purificação .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Cromatografia em fase gasosa .....</b>	<b>26</b>
<b>2.5.5</b>	<b>Identificação e quantificação dos compostos .....</b>	<b>27</b>
2.6	ANÁLISE DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	28
<b>2.6.1</b>	<b>Preparação das amostras.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Análise da atividade das enzimas do sistema de biotransformação de fases I e II.....</b>	<b>29</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Análise da atividade das enzimas do sistema antioxidante 29</b>	
<b>2.6.4</b>	<b>Quantificação de proteínas totais.....</b>	<b>32</b>

2.7	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA	32
2.7.1	Extração de RNA total e síntese de cDNA .....	32
2.7.2	Desenho de iniciadores .....	33
2.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	37
3	<b>RESULTADOS</b> .....	39
3.1	CONCENTRAÇÃO DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES EM TECIDO ADIPOSE DE BOTOS .....	39
3.2	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	50
3.3	BIOMARCADORES MOLECULARES .....	58
3.4	RELAÇÃO ENTRE CONTAMINANTES BIOACUMULADOS E VALORES DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES .....	64
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	69
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	85
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS

Grande parte do crescimento populacional global em países em desenvolvimento tem-se dado em regiões costeiras (CLARK, 1992; MMA, 2007). A intensificação do uso do solo de maneira não planejada e o desenvolvimento econômico destas áreas estão atrelados a diversos impactos ecológicos sobre os recursos naturais locais (MMA, 2007; MUÑOZ; BORTOLUZZI, 2000). Regiões costeiras enfrentam problemas ambientais decorrentes da superexploração de recursos e da contaminação do ambiente aquático, esta última causada pela descarga de efluentes domésticos e de resíduos de atividades industriais e agrícolas (CLARK, 1992; SCHERER et al., 2006). Dentre o rol de resíduos químicos passíveis de serem encontrados em ambientes aquáticos, alguns merecem especial destaque em decorrência de sua prevalência, persistência e/ou toxicidade.

Poluentes orgânicos persistentes (POPs), um grupo de compostos particularmente resistentes à degradação ambiental por processos biológicos, químicos e fotolíticos (PNUMA, 2010), concentram-se no ambiente aquático. Os POPs englobam diversos subgrupos de contaminantes orgânicos, como organoclorados [dicloro difenil tricloroetano (DDT), bifenilas policloradas (PCBs), dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) e dibenzofuranos policlorados (PCDFs)], organobromados (éteres difenílicos polibromados - PBDEs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (BREIVIK et al., 2004; JONES; DE VOOGT, 1999; WANIA; MACKAY, 1996). Além destes compostos, os organoclorados ainda compreendem diversos outros pesticidas, como hexaclorobenzeno (HCB), Mirex, Hexaclorociclohexanos (HCHs) e clordanas.

O DDT, sintetizado primeiramente para controle de doenças transmitidas por vetores, foi amplamente utilizado como pesticida até a década de 70, quando foi proibido nos Estados Unidos da América (EUA) em decorrência dos indícios do seu potencial carcinogênico e de sua relação com alterações reprodutivas na vida silvestre. Estudos mais recentes corroboram os achados iniciais referentes ao potencial carcinogênico de DDTs. Camundongos expostos a altas taxas de DDT apresentaram formação de tumores hepáticos, pulmonares e linfomas (RAKITSKY; KOBLYAKOV; TURUSOV, 2000). Em seres humanos, mulheres que exibiam altas concentrações de DDEs, metabólitos de

DDT, mostraram uma maior propensão à formação de tumores mamários (RAKITSKY; KOBLYAKOV; TURUSOV, 2000). Apesar dos inúmeros dados, no Brasil a produção e comercialização de DDT foram proibidas somente em 2009 (BRASIL, 2009).

Outro pesticida organoclorado amplamente utilizado até a década de 60, o Hexaclorobenzeno (HCB), um hidrocarboneto clorado, tem seu uso direto bastante limitado atualmente, embora o composto ainda seja formado como subproduto na produção de outros químicos, especialmente outros pesticidas (NCBI, 2016a).

Oficialmente considerado um pesticida organoclorado e sendo utilizado especialmente como formicida, o Mirex foi amplamente empregado como retardante de chamas em plásticos, borrachas e tintas. Considerado carcinogênico para mamíferos, sua produção foi cessada em diversos países (NCBI, 2016b). No Brasil, sua importação foi proibida em 1992. Da mesma forma, as clordanas, utilizadas em larga escala como pesticidas até a década de 80 foram proibidas nos EUA em 1988 devido à ampla documentação reportando a persistência e toxicidade deste grupo de compostos (MOORE et al., 1998; OGATA; IZUSHI, 1991).

Além do potencial carcinogênico descrito para DDTs diversos pesticidas organoclorados (clordanas, DDTs e drins) têm sido associados a alterações da capacidade imune de mamíferos, reduzindo a proliferação e atividade de macrófagos e linfócitos (REPETTO; BALIGA, 1997).

Também integrante do grande grupo de organoclorados, as PCBs também têm sido apontados como indutores de tumores em mamíferos (COGLIANO, 1998; LIU; LI; DU, 2010), além de estarem relacionados a quadros de alteração imunológica, especialmente à redução das taxas de proliferação e atividade de linfócitos, redução da citotoxicidade de células natural killer (NK) e aumento da susceptibilidade a infecções virais em tartarugas, camundongos, seres humanos e diversos grupos de mamíferos marinhos (cetáceos e pinípedes) (DE SWART et al., 1996; DESFORGES et al., 2016; LAHVIS et al., 1995; WU et al., 1999; YU; HALBROOK; SPARLING, 2012).

Alterações hormonais também são vistas em quadros de exposição a PCBs (BROUWER; REIJNDERS; KOEMAN, 1989; SCHWACKE et al., 2012; TABUCHI et al., 2006).

PCBs são hidrocarbonetos clorados sintéticos amplamente utilizados até a década de 80 como fluidos isolantes em diversas aplicações industriais e comerciais, como pigmentos, tintas, borrachas,

equipamentos elétricos e hidráulicos devido à sua estabilidade térmica, capacidade de isolamento elétrico e alto ponto de ebulição (TANIGUCHI, 2001). Diversos congêneres de PCBs, com quantidades e posições variáveis de átomos de cloro ligados à estrutura orgânica, podem ser encontrados no ambiente aquático. Congêneres mais clorados são, em geral, mais bioacumulados em organismos aquáticos, tendo em vista que estes compostos são menos voláteis e mais resistentes à degradação (MCKINNEY et al., 2006).

Considerado um grupo emergente de poluentes ambientais, os PBDEs também têm sido utilizados como retardantes de chama em diversos produtos plásticos, têxteis e eletrônicos. Usualmente utilizados apenas como aditivos, os PBDEs podem ser liberados no ambiente aquático através de processos de lixiviação e/ou interação com o meio aquoso (DE WIT, 2002). Sua característica lipofílica o torna passível de sofrer bioacumulação, representando uma possível fonte de contaminação para cetáceos (ALONSO et al., 2014; MCKINNEY et al., 2006).

Estudos também apontam para a capacidade imunotóxica de PBDEs (LEIJS et al., 2009), assim como relatam sua influência sobre a produção de hormônios tireoidianos, embora com uma potência aparentemente menor que aquela observada para outros organoclorados como as PCBs (HALLGREN et al., 2001).

Efeitos endócrino de alguns POPs são decorrentes da sua similaridade estrutural a hormônios estrogênicos, tornando-os capazes de se ligar aos receptores celulares para estes, e desencadear uma cascata de respostas bioquímicas de maneira similar àquela desencadeada pelo hormônio (agonistas), ou apenas impedir que o hormônio se ligue ao seu receptor, impedindo sua ação (antagonistas) (BONEFELD-JØRGENSEN et al., 2001; FOSSI; MARSILI, 2003; LEMAIRE et al., 2006).

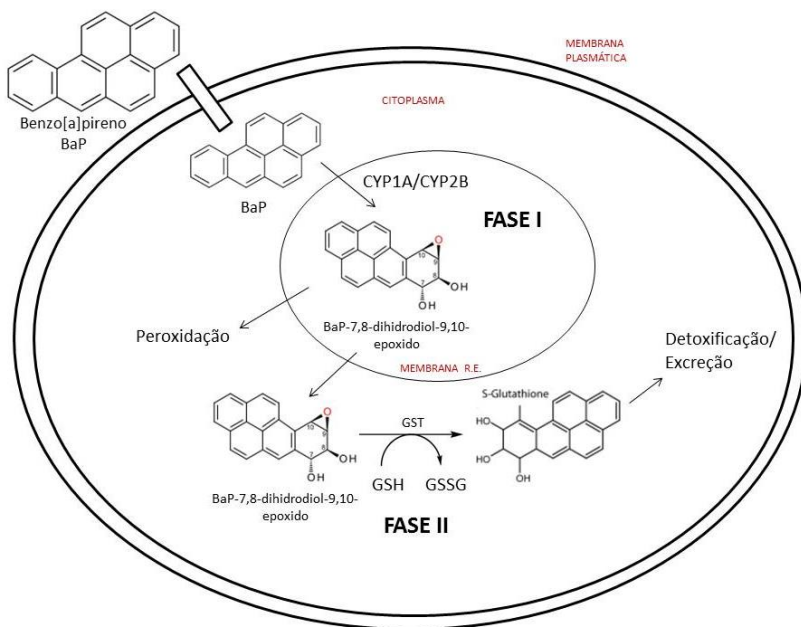
Além dos contaminantes orgânicos, metais-traço podem ser depositados no ambiente aquático através do esgotamento sanitário ou pela deposição de partículas atmosféricas geradas em usinas energéticas, especialmente as que utilizam carvão ou óleo como matriz. Efluentes de indústrias metalúrgicas, atividades de mineração, além de resíduos de fungicidas ou pesticidas utilizados na agricultura também constituem relevantes fontes de metais-traço (ALLOWAY, 2012). A baixa solubilidade e reatividade dos metais-traço contribuem para sua persistência no sedimento e em organismos aquáticos, que usualmente apresentam sintomas de efeitos deletérios associados a estes elementos

anos após a exposição (JAKIMSKA et al., 2011). Alguns metais-traço como zinco, manganês e cobre, são essenciais ao funcionamento de enzimas e mecanismos celulares sendo, portanto, denominados metais essenciais. No entanto, concentrações elevadas dos mesmos podem ser tóxicas. Para metais-traço não essenciais, como chumbo, mercúrio, cádmio e prata, mesmo concentrações baixas são consideradas extremamente tóxicas (JAKIMSKA et al., 2011) e podem levar a quadros de imunossupressão (SCHAEFER et al., 2011).

## 1.2 METABOLISMO DE CONTAMINANTES ORGÂNICOS

Assim como diversos compostos exógenos, POPs são metabolizados pelo sistema de biotransformação de xenobióticos através do qual, compostos lipossolúveis e de difícil degradação são transformados em compostos passíveis de excreção celular (OMIECINSKI et al., 2011; PARKINSON; KLAASEN; WATKINS, 2001).

Classicamente, o sistema de biotransformação é separado em três fases. As duas primeiras, essenciais ao processo de detoxificação, são denominadas reações de fase I e de fase II e consistem, respectivamente, na adição de grupamentos radicalares a compostos lipofílicos, formando metabólitos mais hidrofílicos, e na conjugação de moléculas endógenas aos radicais eletrofílicos destes metabólitos ou de outros xenobióticos, reduzindo sua toxicidade e tornando-os passíveis de excreção, que constitui a terceira fase deste sistema (Figura 1) (BUHLER; WILLIAMS, 1988; EATON; BAMMLER, 1999; HAYES; PULFORD, 1995; PARKINSON; KLAASEN; WATKINS, 2001).



**Figura 1:** Resumo esquemático das fases I, II e III do sistema de biotransformação de xenobióticos em uma célula, apresentando como exemplo a detoxificação do benzo[a]pireno (BaP), um hidrocarboneto policíclico aromático (R.E.: Retículo Endoplasmático; CYP1A/CY2B: Citocromos P450; GST: Glutaciona-S-transferase; GSH: Glutaciona Reduzida; GSSG: Glutaciona dissulfídica)

Dentre as diversas enzimas que podem catalisar reações de fase I da biotransformação, o grupo dos CYP450 merece atenção especial. A maioria dos CYP450 possui atividade monooxigenase, no qual adiciona um átomo de oxigênio molecular ao substrato em questão, tornando-o mais hidrofílico (OMIECINSKI et al., 2011; PARKINSON; KLAASEN; WATKINS, 2001). Este grande grupo de proteínas é subdividido em diversas famílias e subfamílias as quais são responsáveis por distintos processos celulares. Em mamíferos marinhos, a subfamília CYP1A é responsiva a hidrocarbonetos aromáticos planares, PCBs, HPAs e dioxinas (GOKSOYR, 1995), e um de seus membros, CYP1A1, é usualmente utilizado como biomarcador de exposição a POPs mais utilizado para cetáceos em geral.

Responsável pelas reações de fase II do processo de biotransformação de xenobióticos, a glutaciona S-transferase catalisa a

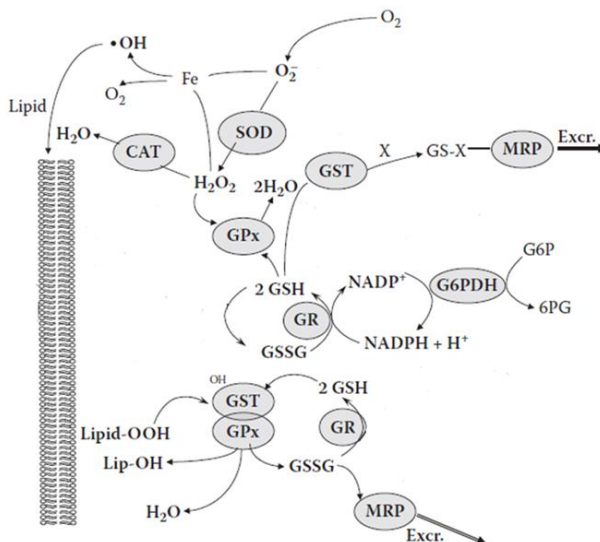
conjugação de glutathiona reduzida (GSH) a xenobióticos ativados. Este processo reduz a reatividade destas moléculas intermediárias, e incrementa ainda mais sua hidrofiliabilidade, possibilitando a excreção (fase III) destes compostos pela célula (OMIECINSKI et al., 2011; PARKINSON; KLAASEN; WATKINS, 2001). Diversas isoformas de GSTs podem atuar na fase II de detoxificação, sendo este grande grupo de enzimas amplamente utilizado como biomarcador de exposição a pesticidas organoclorados em mamíferos (BANERJEE et al., 1999; LÓPEZ et al., 2007). Em moluscos, GSTs citosólicas das famílias Mu, Ômega, Sigma e, especialmente, da família Pi, têm sido apontadas como importantes biomarcadores de exposição a contaminantes orgânicos (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; HOARAU et al., 2001; PÉREZ-LÓPEZ; NÓVOA-VALIÑAS; MELGAR-RIOL, 2002; WAN; WHANG; LEE, 2008; ZHANG et al., 2012).

Além das GSTs, reações de fase II de biotransformação também podem ser catalisadas pela enzima UDP-glucuronosiltransferase (UDPGT), responsável pela conjugação de ácido uridina difosfato-glucurônico (UDP) a xenobióticos ativados.

Além da ativação do sistema de biotransformação de xenobióticos, a exposição a POPs pode levar ao incremento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), influenciando o metabolismo antioxidante celular. Em células aeróbias o processo de respiração celular e a atividade de diversas enzimas são responsáveis pela formação de EROs como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). Embora algumas EROs desempenhem funções importantes nos processos de sinalização celular eles são capazes de reagir com diversas outras moléculas celulares e causar danos a proteínas, lipídeos e DNA (REGOLI; BENEDETTI; GIULIANI, 2011).

Para contrabalancear a produção destas EROs, os organismos aeróbios possuem um sistema de defesa antioxidante. Este sistema é composto por moléculas não enzimáticas (carotenoides, GSH,  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico) e enzimas responsáveis pela transformação de EROs a intermediários menos reativos, como a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a transformação de  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , a catalase (CAT), responsável por catalisar a redução de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , e peroxidases, como a glutathiona peroxidase (GPx), que atuam também catalisando a redução de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos a  $H_2O$  (HALLIWELL, 1996; REGOLI; BENEDETTI; GIULIANI, 2011). Enzimas auxiliares ao sistema de defesa antioxidante, como a glutathiona redutase (GR) que catalisa a

reciclagem de glutathiona dissulfeto (GSSG) a glutathiona reduzida (GSH), e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que, dentre outras funções, mantém os níveis de NADPH necessários para a atividade de GR, também fazem parte do sistema antioxidante (Figura 2) (REGOLI; BENEDETTI; GIULIANI, 2011).



**Figura 2:** Sistema de defesa antioxidante, evidenciando neutralização de EROS como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$  e peróxidos lipídicos (Lipid-OOH) por enzimas antioxidantes (CAT: Catalase, SOD: Superóxido dismutase; GST: glutathiona *S*-transferase, GR: Glutathiona redutase, GPx: Glutathiona peroxidase). Co-fatores, enzimas auxiliares e intermediários de reações também representados. GSSG: Glutathiona dissulfídica, GSH: Glutathiona reduzida, G6PDH: Glicose-6-fosfato desidrogenase, NADP: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado, NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (Adaptado de Regoli, 2011).

A exposição a contaminantes pode contribuir para um aumento na produção de EROs através da redução direta de moléculas endógenas (KASPRZAK, 2002) ou como subprodutos do sistema de biotransformação (SCHLEZINGER et al., 2006). Taxas de formação de EROs mais elevadas que a atividade antioxidante do sistema podem levar ao desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo, em que células encontram-se expostas a dano oxidativo.

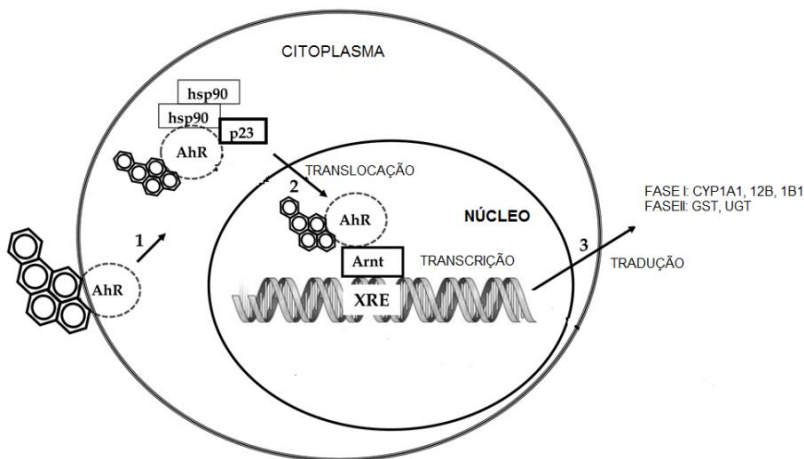
A fim de evitar este quadro, enzimas do sistema antioxidante podem ter sua atividade elevada em resposta a exposição a POPs. Regoli e colaboradores (2011), no entanto, enfatizam que é possível ocorrer, ao contrário, inibição da atividade enzimática em decorrência de outros fatores metabólicos ou ambientais (GIULIANI et al., 2013; REGOLI et al., 2011).

Em mamíferos, a atividade de enzimas antioxidantes, bem como os níveis de peroxidação lipídica, carbonilação proteica e lesões ao DNA (e.g. 8-hidroxideoxguanisina) têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores de estresse oxidativo decorrente de estressores ambientais como POPs (BANERJEE et al., 1999; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; PARK; PARK, 2008; SHAHID et al., 2017).

A transcrição de genes de enzimas antioxidantes e de enzimas envolvidas na fase II de biotransformação são regulados prioritariamente pela rota metabólica de Nrf2-Keap 1. Nrf2 é um fator de transcrição que, em condições basais, encontra-se complexado à proteína repressora Keap 1. Eletrófilos, como EROS, causam a dissociação de Keap-1 e Nrf-2, permitindo que o mesmo seja translocado para o núcleo, estimulando a transcrição de genes responsivos a este fator, como GSTs, UDPGT, CAT, GPx e SOD (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2005).

Paralelamente, níveis de transcrição dos genes de enzimas responsáveis pela fase I de biotransformação são regulados primordialmente pelo sistema do receptor aril de hidrocarbonetos (AHR) e seu translocador nuclear (ARNT). Similarmente à Nrf2, AHR é um fator de transcrição localizado no citoplasma que em condições basais se encontra complexado a proteínas de choque térmico de 90 kDa (HSPs 90). Hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados (PHAHs), PCBs e HPAs permitem a dissociação de AHR da HSP, permitindo que ele seja fosforilado e ativado (PARKINSON; KLAASEN; WATKINS, 2001). Uma vez ativado, AHR forma heterodímeros com ARNT e é translocado para o núcleo, ligando-se a sequências específicas do DNA chamadas de elementos responsivos a xenobióticos (XREs), que por sua vez, ativam a transcrição de genes responsivos que podem levar à formação de enzimas de fase I e fase II de biotransformação de xenobióticos, como os CYP450 (HANKINSON, 1995; MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2006; OHTAKE et al., 2003; PARKINSON; KLAASEN; WATKINS, 2001) (Figura 3).





**Figura 3:** Ativação do sistema AHR/ARNT por benzo-*a*-pireno (BaP). Ativação de AHR, formação do complexo AHR/ARNT, reconhecimento por regiões genômicas denominadas elementos responsivos a xenobióticos (XREs) e ativação da transcrição de genes de enzimas de fase I e fase II de biotransformação. (Adaptado de ARENAS-HUERTERO et al., 2011).

### 1.3 CETÁCEOS COMO ORGANISMOS SENTINELA

Apesar de descrito para a maioria dos organismos vivos, a eficiência do sistema de biotransformação varia de acordo com a espécie ou grupo animal (PARKINSON; KLAASEN; WATKINS, 2001). Tanabe (1988) descreve que cetáceos odontocetos em geral apresentam uma reduzida capacidade de metabolizar PCBs altamente clorados

Cetáceos, como predadores de topo, ainda acumulam grandes concentrações de POPs em decorrência dos processos de bioacumulação e biomagnificação, facilitados pela alta estabilidade destes compostos (KELLY, 2007; VETTER, 2002).

Além de apresentarem concentrações de POPs mais elevadas que as observadas no ambiente, cetáceos possuem grandes depósitos de gordura corporal e elevada expectativa de vida, um conjunto de características que os tornam particularmente importantes para o biomonitoramento da qualidade de ecossistemas aquáticos (BOSSART, 2011; WELLS et al., 2004). Este panorama metabólico também significa que cetáceos estão particularmente mais susceptíveis aos efeitos associados à exposição aguda ou crônica a POPs.

Portanto, desde a década de 80 diversos trabalhos têm buscado mensurar os níveis de contaminantes orgânicos em cetáceos, a fim de monitorar o estado de contaminação destas populações e utilizar estas espécies como organismos sentinela para contaminação por pesticidas organoclorados, PCBs, PBDEs, HPAs e metais-traço (AGUILAR, 1987; ALONSO et al., 2014; FAIR et al., 2010; GARCÍA-ALVAREZ et al., 2014; LAILSON-BRITO et al., 2008). No Brasil, estudos de monitoramento dos níveis de contaminantes em cetáceos têm sido realizados desde o início dos anos 2000, majoritariamente com amostras provenientes de animais encalhados mortos (DORNELES et al., 2008a, 2008b; KAJIWARA et al., 2004; LAILSON-BRITO et al., 2008).

Golfinhos nariz de garrafa, *Tursiops truncatus* (Cetacea: Delphinidae) (Montagu, 1821), popularmente conhecidos no sul do Brasil como botos-da-tainha, são odontocetos cosmopolitas, ocorrendo em mares tropicais e temperados. Por serem utilizados globalmente em oceanários e parques aquáticos, representam uma das espécies mais bem estudada de cetáceos (PERRIN, WÜRSIG, THEWISSEN, 2009). A sua diversidade genética, morfológica e ecológica tem levado à proposição de distintos ecótipos para a espécie, sendo considerados costeiros ou oceânicos (COSTA et al., 2016; PERRIN et al., 2011; SEGURA et al., 2006). Dentre os animais costeiros, ainda é possível identificar grupos dispersos ou residentes a determinados locais. Devido à sua alta fidelidade ao local, estas populações se encontram especialmente expostas à biodisponibilidade de POPs nestas áreas, normalmente consideradas antropizadas.

No sul do Brasil são conhecidas quatro populações residentes de *T. truncatus*: uma residente na Barra de Imbé-Tramandaí, no Rio Grande do Sul (RS) (SIMÕES-LOPES; FABIÁN; MENEGHETI, 1998), uma no estuário do rio Mambituba, no norte do Rio Grande do Sul (RS) (MORENO et al., 2008), uma no Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, em Laguna, sul do estado de Santa Catarina (SC) (DAURA-JORGE; INGRAM; SIMÕES-LOPES, 2013) e por fim, uma população residente no estuário da Lagoa dos Patos, em Rio Grande, extremo sul do RS (FRUET et al., 2011). As duas últimas populações foram analisadas no presente trabalho.

O Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim (28°30'S 48°46'W) se estende por uma área de 255 km<sup>2</sup> (SIMÕES-LOPES; FABIÁN; MENEGHETI, 1998) e é considerada uma área de alta relevância para a conservação (MMA, 2007). Os recursos hídricos do Complexo constituem fonte de renda e subsistência para cerca de

10.000 famílias do município de Laguna e adjacências através da pesca artesanal (MUÑOZ; BORTOLUZZI, 2000). Sua qualidade ambiental, no entanto, encontra-se ameaçada pelas atividades antropogênicas desenvolvidas no entorno de toda a Bacia do Rio Tubarão, ao qual se encontra hidrologicamente interligado. Atividades de mineração de carvão e rizicultura intensiva constituem as principais potenciais fontes de organoclorados, HPAs e metais-traço da região. Souza (2015) encontrou níveis elevados de HPAs em ostras do mangue (*Crassostrea brasiliiana*) mantidas em distintos pontos no Complexo Estuarino, e estudos prévios identificaram níveis também elevados de metais-traço como cádmio, zinco, cobre e manganês tanto no corpo hídrico do Rio Tubarão (LIMA et al., 2001) quanto em ostras do mangue (*Crassostrea rhizophorae*) mantidas em diferentes regiões do Complexo Estuarino (LOPES, 2002).

O Complexo é conhecido também por ser palco de uma interação mutualística, descrita na década de 90, entre botos cooperativos e pescadores artesanais. Nesta interação, os botos agregam os cardumes de peixes, especialmente da tainha (*Mugil* sp.), afugentando-os em direção à bancada de areia onde situam-se os pescadores. Uma vez que a tarrafa é lançada, o cardume se dissipa e se desorienta, facilitando a captura de peixes pelos botos (DAURA-JORGE et al., 2012; SIMÕES-LOPES, 1991). Além da relevância econômica e cultural dos botos, esta população tem sido estimada em apenas 54 indivíduos (DAURA-JORGE et al., 2012). Seu tamanho reduzido torna esta população especialmente sensível à impactos antrópicos que possam alterar parâmetros populacionais como taxa reprodutiva e mortalidade. Além disso, um incremento nas taxas de mortalidade, associado à crescente ocorrência de casos de patologias epidérmicas semelhantes à lobomiose (*Lobomycosis Like Disease*) (Daura-Jorge, comunicação pessoal), considerada oportunista em cetáceos, em indivíduos desta população indicam que a mesma encontra-se exposta a estressores ambientais de relevante impacto.

No extremo sul do estado do Rio Grande do Sul, a Lagoa dos Patos enfrenta problemas ambientais similares. Ao longo de seu estuário (32°05'S, 52°04'W), instalações industriais, petroquímicas e refinarias de petróleo constituem as principais fontes de contaminantes orgânicos, notoriamente HPAs e PCBs (DEL ROSSO, 2005; MIRLEAN et al., 2003; MIRLEAN; ANDRUS; BAISCH, 2003). Estudos prévios encontraram níveis baixos a moderados de zinco, cádmio e chumbo na fauna bentônica, assim como níveis elevados de cromo e cobre

(GARCIA, 2011). Níveis moderados a elevados de HPAs também foram mensurados no sedimento do estuário da lagoa dos patos (DEL ROSSO, 2005; GARCIA, 2004). Este local é utilizado por uma população residente de botos (*T. truncatus*), estimada entre 84 e 86 indivíduos, que tem sido especialmente impactada por pesca incidental (FRUET et al., 2011).

POPs tem o potencial de influenciar diretamente o estado de saúde dos indivíduos, conforme descrito anteriormente. Tais alterações fisiológicas podem se traduzir em impactos sobre as taxas de sobrevivência e de sucesso reprodutivo das populações, comprometendo sua viabilidade em longo prazo (HALL et al., 2006; MURPHY et al., 2010; SCHWACKE et al., 2002). Este reflexo, particularmente importante para populações de tamanho reduzido reforça a necessidade do biomonitoramento dos níveis de contaminantes nestas populações residentes. Além da quantificação de contaminantes propriamente dita, o uso de biomarcadores que permitam identificar tais exposições, ainda que em níveis baixos, e possíveis efeitos subletais também são necessários. Respostas biológicas assim mensuradas possibilitam identificar condições ambientais de potencial impacto a organismos silvestres precocemente, possibilitando atuar de maneira a reverter tal quadro ambiental (LEBLANC; BAIN, 1997).

#### 1.4 OS BIOMARCADORES EM CETÁCEOS

Biomarcadores são alterações moleculares, bioquímicas, celulares e/ou fisiológicas em decorrência de exposição à determinada condição ambiental (STRIMBU; TAVEL, 2011; WHO, 1993). Os biomarcadores podem ser subdivididos em biomarcadores de exposição, que apenas refletem a exposição dos organismos ao(s) determinado(s) composto(s), e biomarcadores de efeito, que expressam efeitos tóxicos causados pelos mesmos (WHO, 1993).

Amplamente estudados em diversos grupos animais, como ostras, mexilhões e peixes (LÜCHMANN et al., 2011; MONSERRAT et al., 2007; PEAKALL, 1994; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; WALKER, 1995), a análise de biomarcadores em cetáceos ainda é incipiente. Alguns trabalhos foram realizados, especialmente buscando avaliar os níveis de enzimas pertencentes ao grande grupo dos citocromos P450 (CYP450) (CELANDER; MOORE; STEGEMAN, 2000; FOSSI et al., 2008, 2016; MCKINNEY et al., 2004).

Em mamíferos marinhos, a subfamília CYP1A é responsiva a hidrocarbonetos aromáticos planares, PCBs, HPAs e dioxinas (GOKSOYR, 1995), e seu membro CYP1A1 tem sido o biomarcador de exposição a POPs mais utilizado para cetáceos em geral e, mais especificamente para *T. truncatus*, através da avaliação dos níveis de atividade 7-etóxi-resorufina-*O*-deetilase (EROD) e dos níveis de transcrição de seu gene e expressão proteica (ANGELL et al., 2004; BACHMAN et al., 2015; BUCKMAN et al., 2011; FOSSI et al., 1992; GARRICK et al., 2006; GOKSOYR et al., 1988; HOOKER et al., 2008; MONTIE et al., 2008; TANABE; IWATA; TATSUKAWA, 1994).

Menos utilizadas em cetáceos odontocetos, enzimas de fase II como as GSTs e UDPGTs têm sido propostas como biomarcadores de resposta a POPs em outros mamíferos marinhos, como cetáceos mysticetos e pinípedes (BENGTSON NASH et al., 2014; KANERVA et al., 2012; MCKINNEY et al., 2004; ROUTTI et al., 2008). Dentre as diversas isoformas de GSTs, as citosólicas das famílias Mu, Ômega, Sigma e, especialmente, da família Pi, têm sido apontadas como importantes biomarcadores de exposição a contaminantes orgânicos (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; HOARAU et al., 2001; PÉREZ-LÓPEZ; NÓVOA-VALIÑAS; MELGAR-RIOL, 2002; WAN; WHANG; LEE, 2008; ZHANG et al., 2012).

Também envolvidos no processo de detoxificação de xenobióticos, especialmente de compostos similares a dioxinas e PCBs, tanto o AHR (Receptor Aril de Hidrocarbonetos), um fator de transcrição, quanto o ARNT (Translocador Nuclear do Receptor Aril de Hidrocarbonetos), seu translocador nuclear, são utilizados como biomarcadores para diversos organismos aquáticos (BAINY, 2007; ZHOU et al., 2010). No entanto, apenas recentemente alguns trabalhos têm proposto e utilizado ambos como biomarcadores em cetáceos (BUCKMAN et al., 2011; FOSSI et al., 2014; NOËL et al., 2014; PANTI et al., 2011).

Além das moléculas envolvidas direta ou indiretamente com o sistema de biotransformação, outros biomarcadores são utilizados em cetáceos. As metalotioneínas (MT) foram utilizadas como biomarcadores de exposição a metais-traço em orcas (*Orcinus orca*) e outros grupos de mamíferos marinhos, como focas-comuns (*Phoca vitulina*) (BUCKMAN et al., 2011; DAS; DEBACKER; BOUQUEGNEAU, 2000; ROESIADI, 1996; ROSS et al., 2002; TOHYAMA et al., 1986). MT são proteínas citosólicas de baixo peso molecular, ricas em grupos sulfidrilas capazes de se ligar a cátions

divalentes, como dos metais-traço, desempenhando papel central na detoxificação e regulação dos níveis celulares destes compostos (CARPENÈ; ANDREANI; ISANI, 2007).

Enzimas do sistema de defesa antioxidante também são consideradas importantes biomarcadores de efeito a contaminação por xenobióticos (GIULIANI et al., 2013; LUCHMANN et al., 2015; ZANETTE et al., 2008). Em mamíferos marinhos, enzimas do sistema antioxidante ainda são predominantemente utilizadas como biomarcadores de estresse oxidativo relacionado aos aspectos fisiológicos do mergulho (CANTÚ-MEDELLÍN et al., 2011; RIGHETTI et al., 2014), mas alguns trabalhos recentes empregaram a análise de enzimas antioxidantes como biomarcadores de contaminação em pinípedes (KANERVA et al., 2012). Em cetáceos, apenas CAT foi empregada como biomarcador de estresse oxidativo decorrente de contaminantes, mostrando atividade mais elevada em golfinhos listrados (*Stenella coeruleoalba*) provenientes de um ambiente contaminado (FOSSI et al., 2013).

Biomarcadores que evidenciem alterações imunológicas e endócrinas em decorrência de exposição a contaminantes também são buscados para cetáceos, especialmente em decorrência do elevado potencial imunotóxico e de alteração endócrina descrito na literatura para as mais diversas classes de poluentes, como metais-traço, PCBs e OCs (DESFORGES et al., 2016; FOSSI; MARSILI, 2003; LAHVIS et al., 1995; SCHWACKE et al., 2002). Esta necessidade é enfatizada pelo crescente número de registros de patologias fúngicas, bacteriológicas e/ou virológicas em grupos de cetáceos de vida livre (JEPSON et al., 2005; MAHFOUZ et al., 2014).

Dentre os biomarcadores imunológicos sugeridos para cetáceos, a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII) (MARSILI et al., 2012; REIF et al., 2009) pode ser considerada promissora, uma vez que está diretamente relacionada à capacidade do organismo de gerar resposta imune a bactérias e fungos, abundantemente presentes no ambiente aquático.

Além de MHCII, citocinas envolvidas na sinalização imunológica como a interleucina-6, interleucina-10 e a interleucina-23, também têm sido utilizadas como marcadores de estresse inflamatório e ou imunológico decorrente de exposição a contaminantes (BUCKMAN et al., 2011; MANCIA et al., 2015; MULLER et al., 2013).

Particularmente, no Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim foi reportada a ocorrência de lesões epidérmicas

semelhantes à lobomicose [*Lobomycosis Like Disease* (LLD)] em botos (DAURA-JORGE; SIMOES-LOPES, 2011). A LLD, uma patologia de origem fúngica, é considerada oportunista em cetáceos (REIF et al., 2009) evidenciando a necessidade de serem incluídos no presente trabalho biomarcadores imunológicos capazes de indicarem quadros de depleção imunológica que explicariam a ocorrência de LLD nos indivíduos desta população, mas não entre botos da população do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande/RS.

Além dos níveis de transcrição de *MHCII*, foram avaliados níveis de transcrição das interleucinas 1, 2 e 17 (*IL-1*, *IL-2*, *IL-17*) e interferon gama (*IFN-γ*). Interleucinas são citocinas, polipeptídeos mediadores de respostas imunes. As citocinas aqui utilizadas foram escolhidas como potenciais biomarcadores imunes para o presente trabalho devido à sua participação em passos essenciais à resposta imune a fungos.

Interleucina-1 é considerada uma citocina chave na resposta imune a microorganismos patogênicos. IL-1 é um pirógeno endógeno, capaz também de estimular a proliferação de linfócitos T e fibroblastos. IL-1 também é considerada uma citocina pleiotrópica, responsável por estimular a síntese de diversas outras citocinas, especialmente IL-2 e interferons. Na pele, fibroblastos, queratinócitos e células de Langerhans são capazes de sintetizar esta citocina (DINARELLO; ENGLAND, 1988).

IFN-γ e IL-2, por sua vez, são citocinas sintetizadas secundariamente, dando continuidade e reforçando a resposta imune. O reconhecimento de antígenos conjugados à molécula MHCII pelo receptor TCR (Receptor de antígeno das células T) desencadeia a transcrição de genes codificadores de IL-2. IL-2, por sua vez, é responsável por ativar linfócitos T, estimular a proliferação de células NK, bem como sua atividade citotóxica (GAFFEN; LIU, 2004). IFN-γ também estimula a atividade citotóxica de células natural killer (NK) e a atração de leucócitos, além de estimular a atividade de macrófagos (SCHRODER et al., 2004). Desta forma, ambas citocinas estão diretamente envolvidas na resposta imune a microorganismos.

De fato, foi observada síntese reduzida de IL-2 e IFN-γ em indivíduos com infecções agudas e crônicas por *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo geneticamente aparentado àquele causador da lobomicose em cetáceos (BENARD et al., 2001; ESPERÓN et al., 2012), reforçando a relevância das mesmas no desenvolvimento da resposta imune eficaz contra infecções fúngicas.

Atuando de maneira mais específica que as citocinas descritas anteriormente, IL-17 também está particularmente relacionada à resposta imune a fungos. Bär e colaboradores (2014) observaram aumento da susceptibilidade a infecções por *Candida albicans* em ratos com síntese reduzida de IL-17 ou que não expressavam o receptor para essa citocina. A reduzida síntese de IL-17 parece levar à deficiência na produção de células Natural Killer (NK) imunocompetentes, tornando os animais menos resistentes a infecções fúngicas sistêmicas.

Em geral, apesar de crescente nos últimos anos, a validação e utilização de biomarcadores em mamíferos aquáticos, particularmente em cetáceos, ainda é um campo de pesquisa pouco explorado, especialmente se considerarmos quão ampla é a utilização destas ferramentas para mamíferos em geral e outros grupos animais, como moluscos bivalves e peixes. Não obstante, estes métodos constituem uma promissora ferramenta para o monitoramento da qualidade do ambiente aquático e dos níveis de exposição de cetáceos a poluentes antrópicos, bem como para a detecção antecipada de possíveis efeitos deletérios associados que possam afetar a viabilidade do indivíduo e da população.

Neste sentido, o presente trabalho se propôs a utilizar biomarcadores bioquímicos e moleculares, correlacionando-os aos níveis de contaminantes orgânicos bioacumulados em botos *T. truncatus* residentes no Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim e no estuário da Lagoa dos Patos a fim de avaliar os níveis de exposição a POPs e avaliar o potencial impacto destes compostos sobre estas populações.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi analisar biomarcadores bioquímicos e moleculares de exposição e de efeito a contaminantes orgânicos e metais-traço em duas populações residentes de boto-da-tainha (*Tursiops truncatus*) do sul do Brasil, a fim de determinar o perfil e nível de contaminação dos locais e seu potencial impacto sobre os cetáceos residentes.



### 1.5.2 Objetivos específicos

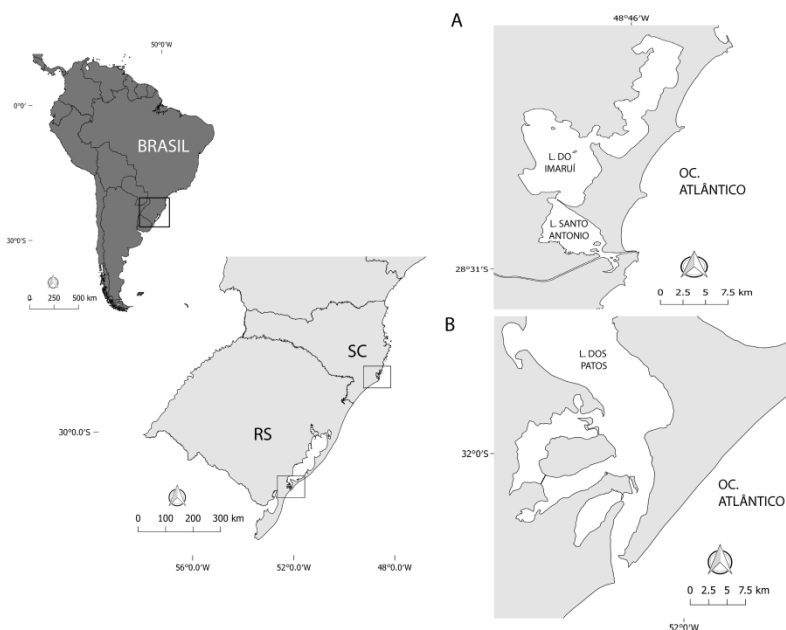
- Quantificar os níveis de pesticidas organoclorados, PCBs e PBDEs em amostras de tecido adiposo de *T. truncatus* residentes no Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, SC, e no estuário da Lagoa dos Patos, RS;
- Avaliar a atividade das enzimas CAT, GST, GR, GPx e SOD e a atividade EROD em amostras epidérmicas de *T. truncatus* das duas áreas;
- Avaliar quantitativamente os níveis de transcritos de *AHR*, *ARNT*, *CYP1A1*, *MT2A*, *MHC-II*, *IL-1*, *GPx*, *GST-pi* e *GR* em amostras epidérmicas de *T. truncatus* das duas áreas estudadas;
- Avaliar a influência de variáveis ecológicas (sexo, faixa etária e estação do ano em que foram realizadas as coletas) sobre os níveis de contaminantes orgânicos e sobre os valores de resposta de biomarcadores bioquímicos e moleculares;
- Correlacionar as concentrações de pesticidas organoclorados, PCBs e PBDEs com as respostas bioquímicas e moleculares identificadas.



## 2 METODOLOGIA

### 2.1 AMOSTRAGEM

Os esforços de coleta foram realizados entre junho de 2015 e março de 2016. Dezesete amostras de tegumento de boto-da-tainha (*Tursiops truncatus*) foram obtidas, sete pertencentes a indivíduos da população residente do Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/SC (CEL) ( $n = 7$ ) e dez pertencentes à população estuarina da Lagoa dos Patos, Rio Grande/RS (ELP) ( $n = 10$ ). As localizações dos dois locais de amostragem são evidenciadas na Figura 4.



**Figura 4:** Localização e ampliação das duas áreas de amostragem. A: Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, sul de Santa Catarina (SC) (CEL), e B: Estuário da Lagoa dos Patos (ELP), extremo sul do Rio Grande do Sul (RS).

Em ambos os locais, a coleta foi realizada durante saídas embarcadas para coleta de dados de dois projetos em andamento

referentes ao monitoramento em longo prazo destas populações de *T. truncatus* (DAURA-JORGE, 2011; FRUET et al., 2015). As saídas no CEL foram realizadas em lancha de alumínio de 6 m de comprimento com motor de popa de 60 HP, enquanto as saídas no ELP foram realizadas em bote inflável de aproximadamente 5,5 m de comprimento, com motor de popa de 90 HP.

A coleta de amostras epidérmicas foi realizada através de biópsia remota. Para isso, foi utilizada uma balestra “Crossbow” 150 lb e dardos modificados, especialmente desenvolvidos para biópsia de cetáceos (WINN; BISCHOFF; TARUSKI, 1973). Estes possuem o corpo de fibra de carbono com um flutuador de poliuretano em sua extremidade anterior, seguido por uma rosca para o encaixe de ponteiros de aço inoxidável. As ponteiros utilizadas neste trabalho possuíam 8 mm de diâmetro e 24 mm de comprimento, penetrando até 10 mm no tecido dos animais.

Os dardos eram disparados da embarcação a uma distância de cinco a dez metros, quando os indivíduos estivessem paralelos à embarcação, buscando atingir o meio do dorso do animal, imediatamente após a nadadeira dorsal (ELLISOR et al., 2013). A fim de evitar contaminação do material biológico por nucleases ou por material biológico de outras origens, bem como prevenir a contaminação do animal amostrado, todas as ponteiros foram previamente lavadas, queimadas em estufa a 280°C por 8 h e embrulhadas em papel alumínio, sendo utilizada uma ponteira distinta para cada animal amostrado.

Todas as coletas foram realizadas sob a autorização do IBAMA/SISBIO nº 47876-1.

## 2.2 PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS

Imediatamente após a coleta, o tecido epidérmico do tegumento foi separado do tecido adiposo em uma placa de Petri utilizando-se material cirúrgico previamente limpo (Figura 5).

O tecido epidérmico foi fracionado em duas sub-amostras de aproximadamente 50 e 100 mg, armazenadas em microtubos de 2 mL livres de nucleases e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise dos biomarcadores bioquímicos e moleculares.

A porção lipídica foi embrulhada em papel alumínio calcinado, tomando-se o cuidado para que não houvesse contato da amostra com qualquer material plástico, armazenada em microtubos de 2 mL e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Este material foi destinado às análises de contaminantes orgânicos.

Ao final do dia de coleta, as amostras eram transferidas para freezer - 80°C para armazenamento até a realização das análises.



**Figura 5:** Fracionamento do material tegumentar de boto-da-tainha, coletado através de biópsia remota, em uma fração epidérmica e uma fração adiposa.

### 2.3 FOTO-IDENTIFICAÇÃO (Foto-ID)

Todos os indivíduos amostrados foram identificados através da técnica de Foto-ID, que utiliza marcas naturais presentes na nadadeira dorsal para a identificação individual (WÜRSIG; JEFFERSON, 1990). Desta forma, foi possível garantir que não houvesse a re-amostragem de indivíduos. Dados sobre os animais amostrados, como faixa etária, área de concentração e sexo, também foram obtidos a partir dos catálogos desenvolvidos pelos projetos de monitoramento (DAURA-JORGE, 2011; DAURA-JORGE et al., 2012; FRUET et al., 2011, 2015; SIMÕES-LOPES; FABIÁN, 1999; SIMÕES-LOPES; FABIÁN; MENEGHETI, 1998).

### 2.4 SEXAGEM

A sexagem dos indivíduos cujo sexo não era previamente conhecido foi realizada a partir de técnicas moleculares. O DNA foi extraído por meio da técnica de “Salting-out” (SUNNUCKS; HALES, 1996) e os genes escolhidos para sexagem foram os da proteína dedo de zinco (*Zinc Finger*

*protein –ZFX*) e da região determinante do sexo Y (*Sex determining region Y – SRY*), conforme o protocolo descrito por Rosel (2003).

Brevemente, porções epidérmicas de aproximadamente 25 mg foram fracionadas e incubadas com proteinase K (20 mg/mL) (New England Biolabs, EUA) por 15 h a 40°C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, contendo 400 mM NaCl, 20 mM EDTA e SDS 0,5%. As amostras foram, então, submetidas a um pulso de sonicação para garantir completa homogeneização do tecido. O homogenato foi submetido à centrifugação a 10.000 g por 20 minutos a 4°C e subsequente adição de 5 M NaCl. O DNA foi precipitado do sobrenadante com isopropanol absoluto e lavado com etanol 70%. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X. A concentração do DNA foi verificada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, UK) a 260 nm. Sua pureza também foi avaliada por meio de espectrofotometria, analisando-se a razão 260/280, que indica contaminação por proteínas, e a razão 260/230, que indica contaminação por sal. Razões próximas a 2 foram consideradas satisfatórias.

Para a reação de PCR, 75 ng de DNA foram adicionados a 25 µL de meio de reação contendo 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 150 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U GoTaq DNA Polymerase (Promega, US) e 0,3 µM de cada par de iniciadores dos genes ZFX (senso: GGCTTGGCAGACTGGCTAAACAAA, antisenso: GCGTGAGAGAAATGCTTCCCACATTC) e SRY (senso: ACATTCCCTACTGTGGACGGACAA, antisenso: GTGGCAGGAGTGAGCTGCTTATG). Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências específicas de *Tursiops truncatus*, depositados no Gen Bank sob os códigos de acesso: XM\_019927717.1 e AB108521.2, respectivamente.

Para a amplificação, foi realizado um ciclo inicial a 95°C, 2 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1min e 72°C por 1minuto. Seguiu-se um ciclo final de 72°C por 5 min e resfriamento a 4°C. 6 µL do produto da PCR, foram aplicados em gel de agarose (2,5%) corados com azul de bromofenol e gelRed. A presença de duas bandas, uma próxima a 492 pb e outra próxima a 350 pb, confirmou a amplificação de ambos os genes, com tamanhos de amplicons esperados em 492pb para SRY e 334 para ZFX, sendo diagnóstico de sexo masculino. A presença de apenas uma banda, próxima a 350 pb, foi considerada confirmação de sexo feminino, uma vez que não houve amplificação de SRY.

Os códigos de identificação individual, bem como informações sobre sexo, faixa etária (quando conhecida), data e coordenadas do local de amostragem são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Resumo dos dados de amostragem para os indivíduos analisados no presente trabalho: Nº da amostra, estabelecida de acordo com local e ordem de coleta, Identificação (ID) segundo catálogo de monitoramento das populações\*, Sexo, Faixa Etária (Juvenil ou Adulto), Data e Coordenadas do local de amostragem.

<b>Nº Amostra**</b>	<b>ID - Catálogo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Faixa Etária</b>	<b>Data de Coleta</b>	<b>X***</b>	<b>Y***</b>
<b>LG1</b>	#3	Macho	Adulto	22-07-2015	711433	6851806
<b>LG2</b>	J42	Fêmea	Juvenil	27-07-2015	713753	6849495
<b>LG3</b>	#16	Macho	Adulto	27-07-2015	717686	6845481
<b>LG4</b>	#46	Macho	Adulto	29-07-2015	714237	6847919
<b>LG5</b>	#48	Macho	Adulto	29-07-2015	715327	6847678
<b>LG6</b>	#32	Macho	Adulto	11-02-2016	714506	6847923
<b>LG7</b>	#51	Fêmea	Adulto	01-03-2016	715907	6847727
<b>RG1</b>	#105	Macho	Adulto	01-06-2015	397781	6439451
<b>RG2</b>	#207	Macho	Juvenil	02-06-2015	398622	6438361
<b>RG3</b>	#137	Macho	Adulto	02-06-2015	397631	6438474
<b>RG4</b>	#208	Macho	Juvenil	02-06-2015	398357	6438540
<b>RG5</b>	Unknown	Macho	Juvenil	08-03-2016	397243	6439322
<b>RG6</b>	#23	Macho	Adulto	09-03-2016	398452	6438306
<b>RG7</b>	#123	Macho	Adulto	09-03-2016	398672	6438090
<b>RG8</b>	#012	Fêmea	Adulto	09-03-2016	396734	6439134
<b>RG9</b>	#142	Fêmea	Adulto	09-03-2016	396734	6439134
<b>RG10</b>	Unknown	Unknown	Juvenil	09-03-2016	396827	6439440

\*Catálogo da população de Laguna baseado nos trabalhos de (DAURA-JORGE, 2011; DAURA-JORGE; INGRAM; SIMÕES-LOPES, 2013; SIMÕES-LOPES, 1991; SIMÕES-LOPES; FABIÁN; MENEGHETI, 1998); Catálogo da população de Rio Grande baseado nos trabalhos de (FRUET et al., 2011, 2015).

\*\*LG: Amostras obtidas no Complexo Estuarino Santo Antônio dos anjos-Imaruf-Mirim, Laguna/SC; RG: Amostras obtidas no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande/RS.

\*\*\*Coordenadas em UTM (Zona 22).

## 2.5 ANÁLISE DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES

As análises de poluentes orgânicos foram realizadas no Laboratório de Química orgânica, do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (LABQOM/IO-USP).

Foram avaliados 50 congêneros de PCBs: 08, 18, 28, 52, 44, 66, 81, 77, 101, 105, 118, 114, 123, 126, 128, 138, 153, 156, 157, 167, 169, 170, 180, 187, 189, 195, 206 e 209 (WHO/NIST/NOAA C-WNN AccuStandard) e 31, 33, 49, 56, 60, 70, 74, 87, 95, 97, 99, 110, 132, 141, 149, 151, 156, 158, 174, 177, 183, 194 e 203 (West Coast Fish Studies C-WCFS AccuStandard). Outros sete congêneros de PBDEs: 28, 47, 99, 100, 153, 154 e 183 (BDE- CSM AccuStandard) e dezesseis pesticidas organoclorados:  $\alpha$ -Clordana,  $\gamma$ -Clordana, Oxiclordana, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH, Heptacloro, Hexaclorobenzeno e Mirex (AE- 00010 AccuStandard) foram mensurados.

Para reduzir o risco de contaminação externa por resíduos orgânicos, todos os materiais laboratoriais utilizados para análise de poluentes orgânicos foram previamente imersos em detergente Extran, lavados em água corrente e secados em mufla a 400°C, com exceção para aos balões volumétricos e coluna de cromatografia. Antes do uso, todas as vidrarias e os materiais foram lavados com a mistura de n-hexano e diclorometano (1:1 v/v) e hexano.

### 2.5.1 Preparo da amostra

Foi utilizada para análise uma alíquota de 0,25 g de gordura de cada amostra. Amostras com massa abaixo de 0,25 g foram utilizadas em sua totalidade. As amostras foram maceradas com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), transferidas para um cartucho do aparelho Soxhlet, sendo adicionado a todas 100  $\mu\text{L}$  de padrão interno (*Surrogate*) constituído por PCB103 (C-103N AccuStandard) e PCB198 (C-198N AccuStandard) em concentração conhecida (1 ng  $\text{g}^{-1}$ ).

### 2.5.2 Extração e concentração da amostra

A extração dos poluentes foi realizada com 80 mL de n-hexano:diclorometano (1:1 v/v) em aparelho Soxhlet, durante 8 h. Um branco do método, contendo apenas  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , e um branco fortificado, adicionado do padrão interno, também foram submetidos à extração, para fins de controle de contaminação e recuperação da extração, respectivamente. Os extratos foram concentrados até o volume final de 2



mL. Uma alíquota de 0,2 mL deste concentrado foi utilizada para quantificação de lipídeos extraíveis, realizada gravimetricamente (UNEP/FAO/IOC/IAEA, 1986).

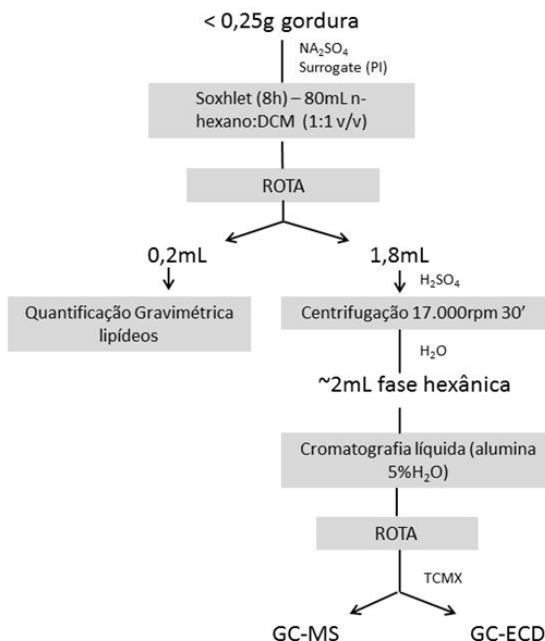
### 2.5.3 Purificação

Para purificação das amostras foi realizado, primeiramente, tratamento com ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), conforme protocolo da UNEP/FAO/IOC/IAEA (1986) para extratos gordurosos.

Brevemente, à alíquota de 1,8 mL de extrato concentrado adicionaram-se 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96%). A mistura foi agitada por 1 minuto em aparelho vórtex e submetida à centrifugação a 1700 rpm por 30 minutos. A fase hexânica foi separada e este extrato foi lavado com água para retirada dos resíduos de ácido sulfúrico.

O extrato final resultante do tratamento ácido foi submetido à cromatografia em fase líquida utilizando como fase estacionária alumina desativada em 5%  $\text{H}_2\text{O}$  e como fase móvel 20ml da mistura 30% de diclorometano em n-hexano.

O eluato foi novamente concentrado a 0,9ml. 90  $\mu\text{L}$  de padrão interno cromatográfico (TCMX) foi adicionado a todos os extratos. O procedimento para obtenção do eluato final é sintetizado no fluxograma abaixo (Figura 6).



**Figura 6:** Fluxograma do processamento de amostras lipídicas e obtenção de eluato para quantificação de poluentes orgânicos através da realização de cromatografia gasosa acoplado a detector de elétrons (GC-ECD) ou espectrômetro de massas (GC-MS).

## **2.5.4 Cromatografia em fase gasosa**

### **2.5.4.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada a detector por captura de elétrons (GC-ECD)**

Pesticidas organoclorados foram quantificados em cromatógrafo a gás (Agilent Technologies) acoplado com detector de captura de elétrons a partir da injeção de 2  $\mu\text{L}$  do extrato final. Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste. A coluna utilizada possuía 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. A rampa utilizada para a separação dos compostos iniciou em 100  $^{\circ}\text{C}$ , permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, em seguida aumentando 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até 140  $^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceu por 1 minuto, novamente subindo a 1,5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até atingir 250  $^{\circ}\text{C}$ , permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, aumentando 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até atingir 300  $^{\circ}\text{C}$ , assim permanecendo por 10 minutos.

### **2.5.4.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)**

Congêneros de PCBs e PBDEs foram quantificados em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Agilent Technologies) a partir da injeção de 1  $\mu\text{L}$  do extrato final. Foi utilizado hélio como gás de arraste. A coluna utilizada possuía 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. Para separação dos compostos, a rampa iniciou em 75  $^{\circ}\text{C}$ , permanecendo nesta temperatura por 3 minutos, em seguida subindo até 150  $^{\circ}\text{C}$  a 15  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , novamente subindo a 2  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até atingir 260  $^{\circ}\text{C}$ , em seguida subindo até 300  $^{\circ}\text{C}$  a 20  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , temperatura final, na qual permaneceu por 10 minutos.

## 2.5.5 Identificação e quantificação dos compostos

Para a análise qualitativa dos compostos, cromatogramas obtidos pela análise cromatográfica para os extratos injetados foram comparados aos padrões conhecidos dos analitos de acordo com seu tempo de retenção e, no caso de PCBs e PBDEs, íons principais e secundários.

A quantificação dos compostos se deu através da construção de curvas analíticas para cada classe de compostos que determinam a resposta do detector de acordo com a concentração do analito. As curvas foram construídas com concentrações de 1, 5, 10, 20, 50, 80, 100, 150 e 200 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ , aceitando-se um índice de correlação maior ou igual a 99,5% ( $r=0,995$ ) (Wade, Cantillo, 1994). O limite de detecção do método (LDM) foi estabelecido para cada composto, conforme a tabela abaixo (Tabela 2).

Para fins de análise deste trabalho foram utilizados apenas os valores normalizados pela massa lipídica, a fim de evitar viés nos valores de concentração de contaminantes devido à variação na composição lipídica ao longo do corpo do boto e profundidade do tegumento, conforme observado por outros autores (ELLISOR et al., 2013; KRAHN et al., 2004; MÉNDEZ-FERNANDEZ et al., 2016).

**Tabela 2:** Limites de Detecção do Método (LDM) para cromatografia a gás acoplada a detector de elétrons (GC-ECD) ou a espectrômetro de massas (GC-MS), em ng g de peso úmido<sup>-1</sup>, para PBDEs, pesticidas e PCBs, respectivamente.

PBDEs	LDM	Pesticidas	LDM	PCBs (8-81)	LDM	PCBs (87-183)	LDM	PCBs (128-209)	LDM
PBDE28	0,631	$\alpha$ -HCH	1,02	PCB8	1,46	PCB87	2,03	PCB128	0,806
PBDE47	0,381	$\beta$ -HCH	2,08	PCB18	1,06	PCB77	0,585	PCB167	0,794
PBDE100	0,798	$\gamma$ -HCH	6,26	PCB31	1,68	PCB110	1,03	PCB174	1,00
PBDE99	1,71	$\delta$ -HCH	0,87	PCB28	1,73	PCB151	0,86	PCB177	0,673
PBDE154	1,174	HCB	1,44	PCB33	1,69	PCB123	1,35	PCB156	1,74
PBDE153	1,073	Heptacloro	1,45	PCB52	2,09	PCB149	0,882	PCB157	0,931
PBDE183	1,485	Oxiclordana	2,13	PCB49	1,46	PCB118	1,20	PCB180	0,539
		$\gamma$ -clordana	1,50	PCB44	1,41	PCB114	1,46	PCB169	1,49
		$\alpha$ -clordana	2,85	PCB74	0,628	PCB153	1,95	PCB170	0,485
		o,p' - DDE	0,659	PCB70	1,28	PCB132	1,45	PCB201	0,354
		p,p' - DDE	1,35	PCB66	1,50	PCB105	1,32	PCB203	0,69

<b>o,p'</b> - DDD	1,72	<b>PCB95</b>	1,02	<b>PCB141</b>	0,762	<b>PCB189</b>	1,31
<b>p,p'</b> - DDD	2,74	<b>PCB56/60</b>	1,04	<b>PCB138</b>	0,500	<b>PCB195</b>	0,711
<b>o,p'</b> - DDT	4,17	<b>PCB101</b>	1,10	<b>PCB158</b>	0,816	<b>PCB194</b>	1,14
<b>p,p'</b> - DDT	1,92	<b>PCB99</b>	1,03	<b>PCB126</b>	1,14	<b>PCB206</b>	0,414
<b>Mirex</b>	0,590	<b>PCB97</b>	1,11	<b>PCB187</b>	0,695	<b>PCB209</b>	0,528
		<b>PCB81</b>	1,14	<b>PCB183</b>	0,961		

PBDEs: Éteres Difênil Polibromados

PCBs: Bifenilas policloradas

Para referência aos dados subsequentes,  $\Sigma$ DDTs refere-se à soma de seis metabólitos do DDT: o,p'DDD, p,p'DDD, o,p'DDE, p,p'DDE, o,p'DDT e p,p'DDT.  $\Sigma$ PCBs compreende os valores obtidos para todos os 49 congêneros avaliados.  $\Sigma$ HCHs foi calculado com base nas concentrações obtidas para  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH e  $\delta$ HCH. Clordanas totais referem-se ao somatório de Heptacloro, Oxiclordana,  $\gamma$ -Clordana e  $\alpha$ -Clordana. Por fim, PBDEs totais compreendem sete congêneros avaliados (PBDEs 28, 47, 100, 99, 154, 153 e 183).

## 2.6 ANÁLISE DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

### 2.6.1 Preparação das amostras

As amostras de epiderme de botos foram descongeladas sobre gelo, pesadas e homogeneizadas em sete vezes o volume de tampão de homogeneização (50 mM Tris HCl, pH 7,4, 150 mM KCl, 1 mM DTT e 0,5 mM PMSF), utilizando o homogeneizador Tissue Tearor (Biospec). Foram necessários aproximadamente cinco ciclos de disrupção de 20 segundos cada, sendo a amostra mantida em gelo entre os ciclos. O homogenato foi centrifugado a 9000 g a 4°C por 30 minutos, e o sobrenadante (fração citosólica ou S9) resultante foi separado em alíquotas e armazenado em -80°C para a análise dos biomarcadores bioquímicos (CAT, SOD, GPx, GR, GST).

Para análise da atividade EROD a fração S9 foi submetida à nova centrifugação, a 100.000 g por 60 minutos. O sobrenadante resultante (SN) foi acondicionado à -80°C. O *pellet*, referente à fração microssomal, foi ressuspensionado em tampão Tris-HCl 0,1M contendo 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,1M KCl e glicerol 20%, e armazenado em freezer -80°C. Ambas as frações foram utilizadas para a análise da atividade EROD.

## **2.6.2 Análise da atividade das enzimas do sistema de biotransformação de fases I e II**

### **2.6.2.1 Análise de atividade EROD**

A atividade catalítica de CYP1A foi avaliada por espectrofluorimetria através da medição da taxa de formação de resorufina produzida através da deetilação do substrato 7-etóxi-resorufina (EROD). Baseando-se nos protocolos estabelecidos por Kennedy e Jones (1994) e em adaptações feitas por Miller (2003) para tecidos tegumentares de cetáceos, foram utilizadas a fração S9 e a fração microsomal, obtidas conforme descrição prévia.

A fração foi incubada por 10 minutos com uma solução de etóxi-resorufina (1,25  $\mu\text{M}$ ) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,8. Foi adicionado às amostras 0,25 mM NADPH em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,8 e leituras de fluorescência (530 nm - comprimento de onda de excitação; 585 nm - comprimento de onda de emissão) foram realizadas a cada 1 segundo durante 60 minutos, a fim de acompanhar a formação do produto (KENNEDY; JONES, 1994; MILLER, 2003). A correlação entre produto e fluorescência foi feita através de uma curva padrão de resorufina.

### **2.6.2.2 Análise da atividade glutatona S-transferase total (GST)**

O ensaio para determinação da atividade GST seguiu o protocolo descrito por Habig (1974), com modificações. Realizado em duplicata, o método avalia o aumento na absorbância (340 nm) a partir da formação do conjugado CDNB-GSH, proporcional à atividade GST. As amostras foram incubadas com meio 1 mM de GSH em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 a 37°C sendo, em seguida, adicionado ao meio 1 mM de CDNB em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. As leituras foram realizadas a cada 30 segundos durante 5 minutos.

A absorbância da amostra foi calculada como  $\text{Abs} = \text{Abs} \cdot \text{min}^{-1}(\text{amostra}) - \text{Abs} \cdot \text{min}^{-1}(\text{branco})$

## **2.6.3 Análise da atividade das enzimas do sistema antioxidante**

### 2.6.3.1 Análise da atividade de superóxido dismutase (SOD)

Para quantificação da atividade SOD, foi realizado ensaio baseado na diminuição das taxas de redução do citocromo c por radicais gerados através da ação da enzima xantina oxidase, na presença da SOD.

Brevemente, ao meio de reação contendo 10  $\mu\text{M}$  citocromo c, 50  $\mu\text{M}$  xantina, 100  $\mu\text{M}$  EDTA e 20  $\mu\text{M}$  KCN em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,8, adicionou-se xantina oxidase (X.O.) a fim de determinar as taxas de redução de citocromo c na ausência de SOD pelo aumento da absorbância a 550 nm (Abs0, representa o “branco”).

Para obtenção da taxa de inibição, uma leitura (Abs1) contendo 1  $\mu\text{L}$  de amostra adicionada ao meio era comparada ao valor obtido pelo branco. A taxa de inibição foi calculada como:

$$TI = 100 - (100 \cdot (Abs1 - Abs0))$$

As leituras foram realizadas por 1 minuto e 30 segundos, a 37°C. Para cálculo de Unidades de SOD (USOD):

$$USOD = \frac{\frac{TI}{50}}{Vol. Prot}$$

Sendo,

Vol = volume da amostra (mL)

Prot = proteínas totais da amostra ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

### 2.6.3.2 Análise da atividade Catalase (CAT)

Para quantificação da atividade CAT seguiu-se o protocolo de (AEBI, 1984) que avalia as taxas de degradação do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água e oxigênio através da diminuição da absorbância a 240 nm.

Para tal, um meio de reação contendo 5 mM de EDTA,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30% e triton em tampão TRIS 1M pH 8,0 foi aquecido a 30°C, sendo este adicionado sobre a amostra ou sobre o tampão de homogeneização (Branco) em uma placa de 96 poços. As leituras foram realizadas a cada 20 segundos por 1:30 minutos.

### 2.6.3.3 Análise da atividade glutathiona peroxidase (GPx)

Para quantificação da atividade GPx seguiu-se o protocolo descrito por Flohé e Günzler (1984), que mensura sua atividade

indiretamente, através da diminuição na absorbância (340 nm) devido ao consumo de NADPH pela glutathiona redutase (GR) que atua reciclando GSSG formado pela ação da GPx.

Incubou-se as amostras com meio de reação contendo 5 mM EDTA, 1,5 mM GSH, 200  $\mu$ M NADPH e 1,2 U/ml de GR em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH7,0 por 10 minutos, a fim de determinar o consumo de NADPH independente de GPx (Branco de amostra - BrAm e Branco - BR). Em seguida, adicionou-se solução de peróxido de cumeno 0,38% (CuOOH) e realizou-se a leitura por 10 minutos, a cada 10 segundos (Amostra leitura – AmL e Branco leitura – BrL).

O valor de absorbância da amostra foi calculado como  $Abs = [Abs.min^{-1}(AmL) - Abs.min^{-1}(BrAm)] - [Abs.min^{-1}(BrL) - Abs.min^{-1}(BR)]$ .

#### 2.6.3.4 Análise da atividade glutathiona redutase (GR)

Para quantificação da atividade GR foi seguido o protocolo de Carlberg e Mannverick (1985), que avalia a queda na absorbância a 340 nm decorrente do consumo de NADPH pela GR.

Brevemente, a amostra foi incubada com meio de reação (contendo 5 mM EDTA, 2 mM GSSG e 150  $\mu$ M GSH em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0) ou meio branco (5mM EDTA e água deionizada em tampão fosfato 0,1 M, pH7,0) por 10 minutos a 37°C, a fim de determinar a taxa de queda de absorbância independente do consumo de NADPH (Branco de amostra – BrAm e Branco de tampão – BRT, respectivamente).

Em seguida foi adicionada a solução 0,6 mM de NADPH sendo a leitura cinética realizada a cada 30 segundos por 5 minutos (Leitura amostra - Am).

O valor de absorbância foi calculado como  $Abs = [(Am - BrAm) - BRT]$ .

A atividade de GST, CAT, GPx e GR foram calculadas a partir da fórmula abaixo:

$$Atividade = \frac{\frac{Abs}{\epsilon} * Vol. Tot}{Prot * Vol. amo}$$

Sendo,

$Abs = Abs.min^{-1}(amostra)$

$\epsilon$  = coeficiente de absorvidade molar (NADPH -  $6,22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  
CDNB -  $9,6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  -  $0,0436\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

Vol.Tot = volume total do ensaio (mL)

Prot = proteínas totais da amostra ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )

Vol.Amo = volume da Amostra (mL)

## **2.6.4 Quantificação de proteínas totais**

A concentração de proteínas totais presentes na fração S9 de cada amostra foi determinada utilizando-se o método descrito por Bradford (1976), através da comparação com valores de absorbância obtidos para uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA), construída com concentrações de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

## **2.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA**

### **2.7.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA**

Para a extração de RNA total foi utilizado o Kit RNeasy Fibrous Tissue (Qiagen, EUA), específico para tecidos fibrosos. Resumidamente, aproximadamente 30 mg de material tegumentar foi descongelado sobre gelo, homogeneizado em tampão fornecido pelo kit (1:10 m:v) com TissueRuptor (Qiagen, EUA) em, usualmente, um ciclo de 20-40 segundos. O homogenato foi incubado com 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K a  $55^\circ\text{C}$  por 10 minutos e, em seguida, centrifugado (10.000 g por 3 minutos). Ao sobrenadante foi adicionado etanol 100% (1:0,5 v:v), sendo a amostra resultante transferida para as colunas MiniSpin do kit. Para que o material ficasse aderido à membrana da coluna foram realizadas duas centrifugações sucessivas e, em seguida, foi realizada uma incubação a temperatura ambiente por 15 minutos com solução de DNase. Para lavagem do DNA degradado, foram realizadas duas lavagens com tampão fornecido pelo kit, seguidas de centrifugação ( $\sim 8000$  g por 15 segundos). Foram feitas duas eluições do RNA aderido à membrana, com 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  livre de nucleases cada.

A concentração e pureza do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, UK) a 260 nm, e pelas razões 260/280 e 260/230 que indicam contaminação do material por proteína e sal, respectivamente.

A partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit QuantiTec Reverse Transcription (Qiagen,



EUA), conforme descrito no protocolo do kit. A concentração e a pureza do cDNA foram checadas conforme descrito anteriormente. O cDNA foi armazenado a -20°C até a realização da qPCR.

### 2.7.2 Desenho de iniciadores

Foram utilizadas para o desenho dos iniciadores sequências específicas de *Tursiops truncatus* depositadas no Gen Bank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, sob os seguintes números de acesso: CYP1A1 - XM\_004328798.1; AHR - XR\_186079.1; ARNT - XM\_004318637.1; MT2A - XM\_004322332.1; MHCII - EF690293.1; IL-1 $\alpha$  - AB028215.1; GST pi Like- XM\_004319191; GPx 4 - XM\_004332582.1 e GR - XM\_004321342.1. Como possíveis genes normalizadores, foram avaliadas as proteínas ribossomais RPS18 e RPL4, depositadas no Gen Bank sob os números de acesso XM\_004319421.1 e XM\_004320806.1, respectivamente, bem como a beta actina (*BACT*), o complexo succinato desidrogenase (*SDHA*) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) depositados no GenBank sob os números de acesso AB603937.1, DQ404540.1 e XM\_004322381.1. Todos os genes testados para normalização foram previamente sugeridos como normalizadores para *T. truncatus* (MANCIA et al., 2014; SPINSANTI et al., 2006).

Os iniciadores para as reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), bem como para PCR convencional utilizada para sexagem dos indivíduos, foram desenhados através da ferramenta PrimerQuest da IDT DNA, especificando para qPCR um tamanho ótimo de produto de PCR em 180 pb e para PCR convencional amplicon ótimo de 350 pb (Tabela 3). Os iniciadores desenhados foram avaliados quanto à formação de *Hairpin*, dímeros próprios e não-próprios e similaridade entre temperatura de anelamento ( $T_m$ ), e sua qualidade e complexidade linguística avaliadas pelo programa FastPCR 6.5 (Primer Digital). Para a qPCR foi utilizado o kit QuantiNova SYBR Green PCR (Qiagen, EUA) e a amplificação foi realizada em um sistema Rotor-Gene 6000 real-time qPCR (Qiagen, EUA). As reações foram realizadas, para cada amostra, em um volume final de 20  $\mu$ L por reação, sendo 10  $\mu$ L de 2x QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix, 2  $\mu$ L de cada iniciador e 8  $\mu$ L de cDNA diluído para totalizar 100 ng de cDNA por reação ou, para genes pouco expressos, 200 ng cDNA por reação. A reação de amplificação foi realizada através de um ciclo a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos.

Para avaliar a especificidade dos iniciadores, o produto da PCR foi submetido a uma curva de *melting*, medindo-se a fluorescência a cada 1°C aumentado, na faixa de 55°C a 98°C.

Para análise da eficiência (E) de cada par de iniciadores foi realizada a amplificação de uma curva padrão de diluição seriada em cinco concentrações (12,5, 25, 50, 100 e 200 ng) ou (50, 100, 200, 400, 800 ng) para genes pouco expressos. A curva padrão foi preparada a partir de um *pool* de quantidades iguais de cDNA de todas as amostras analisadas. Os valores de *cycle threshold* (Ct) obtidos para cada amostra foram utilizados para os cálculos de quantificação de transcrição relativa dos genes alvo normalizada pelos genes referência:  $\Delta CT$  e  $2^{-\Delta CT}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

**Tabela 3:** Iniciadores utilizados para análise da biomarcadores moleculares. Detalhamento das suas sequências, conteúdo de guanina e citosina (%GC), temperatura de anelamento (TM), qualidade e eficiência dos iniciadores, bem como tamanho do amplicon gerado e cycle treshold (Ct) para cada gene avaliado.

Gene de Interesse		Sequência	%GC	TM	Qualidade do Iniciador	Tamanho do Amplicon	Eficiência (E)	R^2	Threshold
<b>AHR</b> ( <i>Receptor Aril de Hidrocarboneto</i> )	Senso	ACAGCAGCATCAGAAGCACAGA	50	58,7	89	116	1,12	0,989	0,08762
	Anti-senso	AAGGCACGGATTGGTTCGAGTT	50	58,9	90				
<b>ARNT</b> ( <i>Translocador nuclear de AHR</i> )	Senso	GACGGAACAAGATGACAGCCTACATAAC	46,4	58,7	80	112	0,99	0,996	0,14932
	Anti-senso	TGAGAAACCGCCATGCGTAAGA	50	58,7	88				
<b>B-ACTINA</b> ( <i>β-actina</i> )	Senso	TCACCATTGGCAACGAGAGGTT	50	58,8	88	156	1,02	0,995	0,2102
	Anti-senso	ACAGCACCGTGTTGGCATAGA	52,4	58,9	85				
<b>CYP1A</b> ( <i>Citocromo P450 1A</i> )	Senso	GACACAGTCACAACCGCCATCTC	56,5	59,8	89	168	-	-	-
	Anti-senso	GGTCTCCAGAATGAACGCCTCCAAATA	48,1	60	85				
<b>GAPDH</b> ( <i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i> )	Senso	CCCAGAACATCATCCCTGCTTCC	56,5	59,5	91	190	1	0,996	0,08253
	Anti-senso	GACGCTTGCTTCACCACCTTCTT	52,1	59,6	85				
<b>GPx</b> ( <i>Glutathiona peroxidase</i> )	Senso	CCAGGGAGTAATGCCGAGATCAAAGA	50	59,8	80	220	0,99	0,997	0,51801
	Anti-senso	GCCGTTCTTGTCATGAGGAACTTGG	50	59,8	91				
<b>GR</b> ( <i>Glutathiona redutase</i> )	Senso	GCAGTGTCATCGTTGGTGCTGGTTACAT	50	62,4	82	191	0,99	0,987	0,24676
	Anti-senso	ATCTGGAATGGTGGTCAAGGTGGGTTTC	50	62,1	85				
<b>GST-pi</b> ( <i>Glutathiona-S-transferase</i> )	Senso	CCGCCCTACACCATCGTCTACTT	56,5	60	78	208	1,10	0,996	0,47087
	Anti-senso	AATGAGGTCTCCATCCTGGAACCTGG	50	59,9	88				

<i>isoforma pi)</i>										
<b>IL-1</b> ( <i>Interleucina-1</i> )	Senso	TGAACCACTTCATCAGGACTGC	50	56,9	88	124	1,08	0,971	0,00947	
	Anti-senso	TCAGAATCTTCCCCTTGGCTG	52,4	57	92					
<b>IL-2</b> ( <i>Interleucina-2</i> )	Senso	CATGCCCAAGAAGGCTACAGAATTGA	46,1	58,9	79	87	-	-	-	
	Anti-senso	TGAGCAACATTTAGCACATCCTCCAG	46,1	58,8	87					
<b>IL-17</b> ( <i>Interleucina-17</i> )	Senso	TCCAGAAGACCCCTCCGATTACTACAAAC	42,4	59,1	85	131	-	-	-	
	Anti-senso	TCAGCATTGACACAGCCCAAGT	50	59	82					
<b>IFN-g</b> ( <i>Interferon-γ</i> )	Senso	ATGGCAGCTCTGAGAACTGGATG	50	58,9	85	124	-	-	-	
	Anti-senso	GATCTTGGCGACAGGTCCTTCAT	52	58,7	87					
<b>MHCII</b> ( <i>Complexo Principal de Histocompatibilidade II</i> )	Senso	GCTCTAAACCACCACAACCTGC	54,5	58,7	95	194	1,08	0,999	0,03628	
	Anti-senso	GGTGTAGACATCTCCTTGCTGGGGA	56	61,6	95					
<b>MT2A</b> ( <i>Metalotioneína 2A</i> )	Senso	TGCAAAGGGACCTCAGACAAGTG	52,2	59	86	96	1,02	0,993	0,19663	
	Anti-senso	GGAATGTAGGTTTGCTCGTTGCT	48	59	94					
<b>RPL4</b> ( <i>Proteína ribossomal L4</i> )	Senso	GCGAATGAGAGCTGGCAAAGG	57,1	59	91	199	0,98	0,995	0,0522	
	Anti-senso	AGTCCAAATGCAGAAACGTCCCA	47,8	58,8	92					
<b>RPS18</b> ( <i>Proteína ribossomal S18</i> )	Senso	TCCGTGAAGACCTGGAGCGA	60	59,3	96	92	1,08	0,994	0,0728	
	Anti-senso	CTTGGTGTGCTGGCCTCGTA	60	59,6	96					
<b>SDHA</b> ( <i>Succinato desidrogenase</i> )	Senso	CATCCACCGCATCAGAGCAAAGAAC	52	60	87	194	1,13	0,987	0,03686	
	Anti-senso	TGATGAGACAGCCAGCACCGTAT	52,1	60	94					

## 2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A avaliação da normalidade dos dados foi realizada através da análise de histogramas e gráficos quantis-quantis, que contrapõem os quantis amostrais a quantis teóricos de uma distribuição normal. Linhas de tendência para uma distribuição normal, construídas a partir dos valores de média e desvio padrão da amostra avaliada, também foram incluídas nos gráficos quantis-quantis a fim de avaliar o ajuste dos dados a esta linha. A análise de homoscedasticidade foi realizada a partir de boxplots (ZUUR; IENO; ELPHICK, 2010).

Para comparação dos valores de resposta de biomarcadores entre grupos de botos, delineados com base no sexo, faixa etária e estação de coleta, foi utilizado o teste de Wilcoxon para dados que não satisfiziam a normalidade, ou o teste-t de *student* para os dados que satisfizeram requisito de normalidade e homoscedasticidade. A diferença entre a razão  $\sum DDTs / \sum PCBs$  para botos do CEL e botos do ELP foi calculada através do teste de Wilcoxon.

Para avaliar a influência conjunta de variáveis ecológicas (sexo, faixa etária, local e estação de coleta) sobre os valores de POPs bioacumulados, foram construídos modelos lineares generalizados (GLMs) (NELDER; WEDDERBURN, 1972) para cada classe de POP. Além disso, uma análise fatorial para dados mistos (FAMD) disponível através do pacote FactoMineR (HUSSON et al., 2008), desenvolvido para o software R (R Core Team, 2014) foi desenvolvida a fim de avaliar a relação entre todas as variáveis ecológicas e químicas (valores de POPs).

Níveis de correlação entre concentrações de distintas classes de POPs e biomarcadores bioquímicos e moleculares foram avaliados individualmente (cada classe de POP x cada biomarcador) através do cálculo do 'r' de Spearman.

Estudo prévio reportou dois padrões distintos do uso de área para botos de Laguna. Para avaliar a influência deste padrão sobre os níveis de POPs totais bioacumulados, também foi realizada uma análise de correlação, através do 'r' de Spearman, entre a concentração de POPs totais e a área de concentração dos animais, calculada por meio do método de densidade de Kernel 50, que permite identificar a área de concentração dos indivíduos, representativa de 50% das ocorrências (SEAMAN; POWELL, 1996). Para este cálculo foi utilizado o primeiro registro do dia para cada indivíduo, obtido durante os esforços de

monitoramento e foto identificação da população de Laguna, realizados de 2007 a 2009 e de 2013 a 2015.

Por fim, para melhor visualização da correlação entre classes de POPs e biomarcadores, bem como para identificação das variáveis que melhor explicaram a variação das amostras, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA), com os dados normalizados e centralizados.

Todas as análises foram realizadas no software R3.3.1 (R Core Team, 2014). Para todas as análises, foi considerado significativo  $p \leq 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CONCENTRAÇÃO DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES EM TECIDO ADIPOSEO DE BOTOS

As amostras de gordura, dedicadas à análise de contaminantes orgânicos, apresentaram massa inicial variando de 0,06 a 0,26 g de peso úmido, sendo a maioria utilizada em sua totalidade para a obtenção do eluato final.

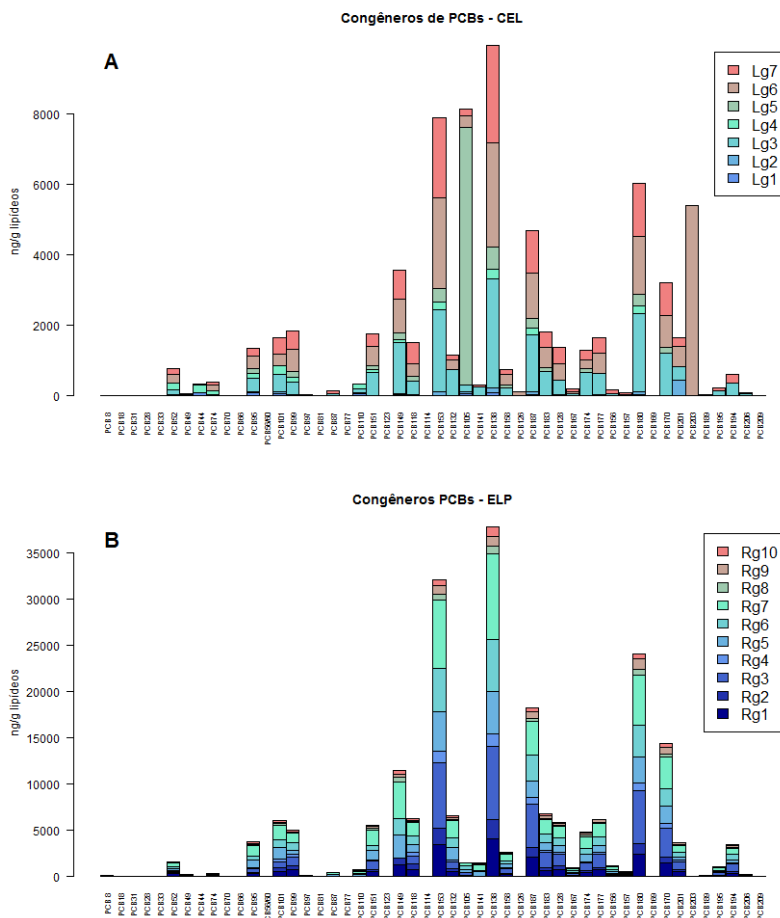
Os valores de contaminantes bioacumulados apresentados no texto referem-se à concentração normalizada pela massa lipídica, em ng g lipídeos<sup>-1</sup>.

Entre os POPs quantificados,  $\Sigma$ PCBs foram prevalentes nas amostras de ambos os locais. O perfil de congêneros de PCBs mensurados também é semelhante entre indivíduos e populações amostradas (Figura 7).

Em ambas as localidades, as hexaclorobifenilas (PCB128 a PCB169) foram os congêneros mais frequentes, seguidos de pentaclorobifenilas (PCB82 a PCB127) e heptaclorobifenilas (PCB170 a PCB193). Para este grupo de contaminantes, os botos do Estuário da Lagoa dos Patos (ELP) apresentaram níveis médios ( $21.560,15 \pm 16.513,08$  ng g lipídeos<sup>-1</sup>) aproximadamente duas vezes maiores que os identificados nas amostras de botos do Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim (CEL) ( $10.092,17 \pm 8.925,19$  ng g lipídeos<sup>-1</sup>). Apesar de numericamente distintas, as médias de  $\Sigma$ PCBs obtidas para as amostras do CEL e do ELP não foram consideradas significativamente diferentes ( $W=19$ ,  $p>0,05$ ).

Para  $\Sigma$ DDTs, foi observado um quadro inverso daquele identificado para  $\Sigma$ PCBs. Para indivíduos do CEL a concentração média de  $\Sigma$ DDTs ( $5.304,04 \pm 6.059,71$ ) foi mais de duas vezes maior que aquela obtida para indivíduos do ELP ( $2.227,88 \pm 1.905,06$ ). Esta distinção foi considerada estatisticamente significativa pelos resultados dos modelos lineares generalizados (GLMs) ( $p<0,05$ ). Além de valores absolutos maiores, o somatório de pesticidas ( $\Sigma$ DDTs, Clordanas,  $\Sigma$ HCHs e Mirex) representa de 26 a 45% do total de POPs para animais residentes no CEL. Para animais do ELP, os pesticidas são menos representativos, e correspondem a apenas 2 a 12% do total de POPs. No entanto, o perfil de pesticidas foi similar entre os locais. Considerando todas as amostras conjuntamente é possível observar que, tanto na

população residente do CEL, quanto na população do ELP,  $\Sigma$ DDTs representam os pesticidas mais frequentes, sendo p,p'DDE o metabólito predominante em todas as amostras avaliadas (Figura 8).

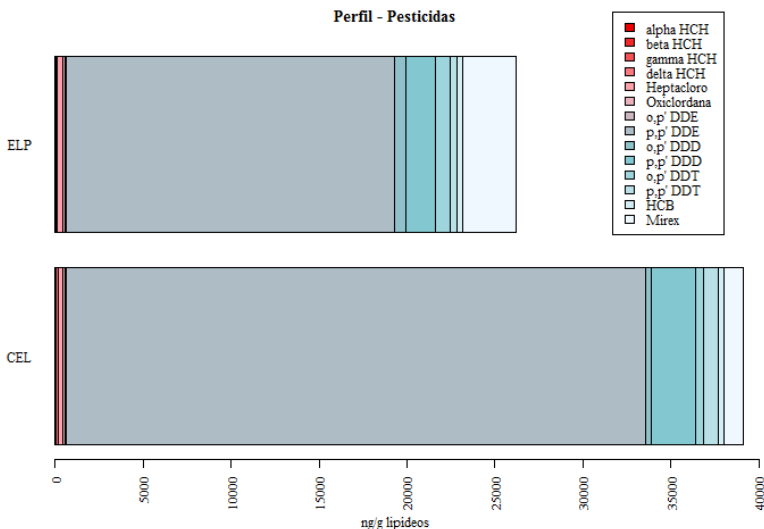


**Figura 7:** Perfil de congêneros de PCBs quantificados em amostras tegumentares de *T. truncatus* do Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/SC (CEL) (A) e do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande/RS (ELP) (B). Concentração em ng/g lipídeos.

Além de  $\Sigma$ DDTs, o HCB, quantificado em mais de 70% das amostras, e o heptacloro, presente em 64% das amostras, constituem dois outros importantes grupos de pesticidas avaliados. Os maiores



níveis de HCB foram identificados em animais amostrados no CEL ( $49,89 \pm 62,20$ ) quando comparados aos de amostras provenientes de ELP ( $28,26 \pm 20,81$ ).



**Figura 8:** Perfil de pesticidas bioacumulados em *T. truncatus* do Complexo Estuarino Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/SC (CEL) e do estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande/RS (ELP). Concentração total de pesticidas, em ng g lipídeos-1, calculada a partir dos valores totais de todas as amostras de cada local (CEL - n = 7; ELP - n = 10).

Dentre as clordanas, o heptacloro foi o composto mais representativo, sendo encontrado em concentrações similares entre amostras provenientes do CEL ( $31,64 \pm 58,41$ ) e de ELP ( $37,2 \pm 70,01$ ). Outra clordana de ocorrência relevante, a oxiclordana foi quantificada em 22% das amostras, em concentrações que variaram de abaixo do limite de detecção (<LD) a 96,46 para amostras do CEL, e de <LD a 55,09 para indivíduos de ELP. Considerando o total de clordanas ( $\Sigma\text{CHLs}$ ), animais amostrados em CEL apresentaram concentração média de 49,77, enquanto animais amostrados em ELP apresentaram concentração média de 45,70. Não foram detectados níveis de HCHs em nenhuma das amostras avaliadas.

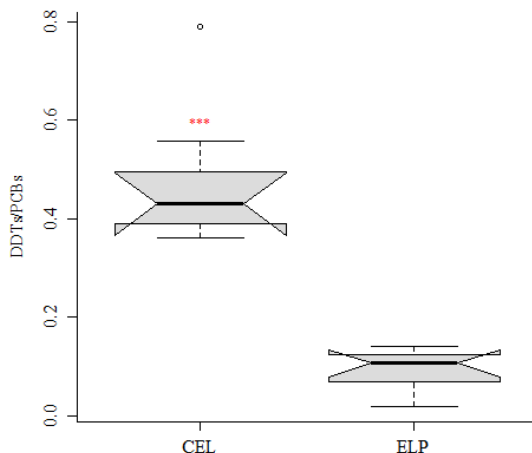
Resíduos de Mirex foram quantificados em 94% das amostras de botos. Os níveis deste composto são significativamente mais elevados

em amostras do ELP ( $308,27 \pm 185,17$ ) que do CEL ( $158,01 \pm 107,53$ ) ( $p > 0,05$ ).

Por fim, as concentrações de  $\Sigma$ PBDEs foram similares entre os locais de amostragem (CEL –  $227,97 \pm 221,60$ ; ELP –  $277,44 \pm 214,59$ ). Em ambas as localidades, PBDE47 foi o congênero predominante, seguido de PBDE100. Três indivíduos do CEL também apresentaram concentrações acima do LD de PBDE153, um congênero ausente em todas as amostras provenientes do ELP, e outros dois indivíduos do CEL também apresentaram concentrações acima do LD de PBDE99, igualmente ausente das amostras de ELP. PBDE154 também foi quantificado em dois indivíduos, um de CEL e outro de ELP. Os congêneros PBDE28 e PBDE183 não foram identificados em nenhum boto.

Embora tenham sido incluídos padrões de referência de Aldrin, Dieldrin, Endrin, Endossulfan (congêneros I e II), Metoxicloro e Heptacloro Epóxido (congêneros A e B) para a análise cromatográfica, nenhum destes compostos foi identificado nas amostras avaliadas, possivelmente em decorrência do tratamento ácido aplicado anteriormente para purificação dos extratos gordurosos. Este tratamento desencadeia alterações nos compostos citados impossibilitando sua quantificação (UNEP/FAO/IOC/IAEA, 1986).

Em botos de CEL os valores de  $\Sigma$ DDTs/ $\Sigma$ PCBs apresentaram média ( $0,478 \pm 0,151$ ) significativamente maior que aquela obtida a para os indivíduos de ELP ( $0,094 \pm 0,04$ ) ( $W=0$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 9), indicando diferenciação entre locais quanto aos aportes de contaminantes orgânicos.



**Figura 9:** Boxplot evidenciando mediana e intervalo interquartilico da razão  $\Sigma\text{DDTs}/\Sigma\text{PCBs}$  para indivíduos amostrados na população do CEL e do ELP. \*\*\* $p < 0,001$ . Entalhes indicam intervalo de confiança (95%), e dados discrepantes são identificados como pontos externos às hastes.

De maneira geral, todos os compostos quantificados apresentaram concentrações altamente variáveis entre indivíduos, independentemente do local de amostragem.

Resultados referentes à influência de variáveis ecológicas sobre o padrão de bioacumulação de POPs permitem compreender em parte esta variação. GLMs construídos para cada classe de POP evidenciam que sexo é uma variável de influência significativa para os valores de PCBs, DDT e Mirex bioacumulados (Tabela 4). Para PBDEs e HCB, sexo também é incluído no modelo melhor ajustado, embora sua contribuição não seja significativa. Em todos estes modelos o nível ‘macho’ apresenta valores de coeficiente negativo. A estação de coleta também exerce influência significativa, especialmente sobre os valores de PCBs, DDTs e HCB bioacumulados (Tabela 4). Além disso, foi a única variável ecológica incluída no modelo melhor ajustado para clordanas. Em todos os modelos, o nível ‘inverno’ apresenta valores de coeficiente positivos.

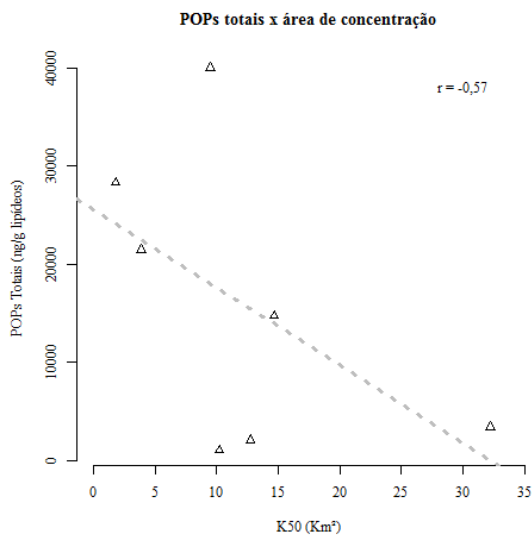
Para DDTs e Mirex, ‘local’ foi considerada uma variável de influência significativa, apresentando um valor de coeficiente para o nível ‘ELP’ positivo para o primeiro e negativo para o segundo. Local também foi incluído no modelo melhor ajustado para HCB,

apresentando um coeficiente positivo para o nível ‘ELP’. Faixa etária não foi incluída em nenhum dos modelos melhor ajustados (Tabela 4).

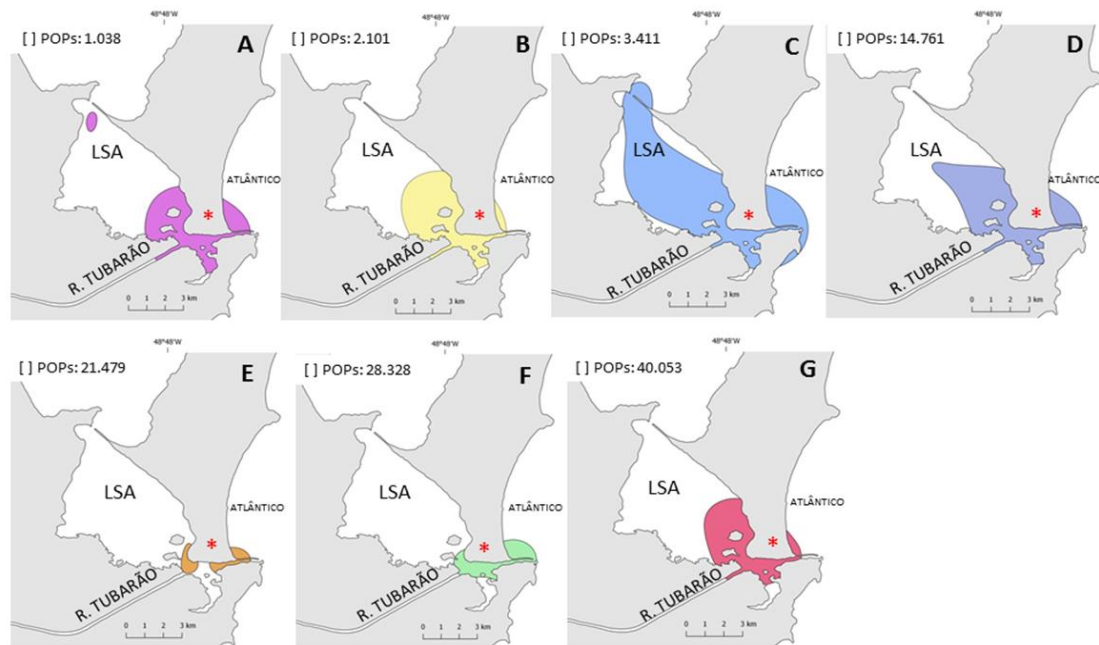
**Tabela 4:** Modelos lineares generalizados (GLMs) melhor ajustados para cada classe de POP, para os parâmetros: sexo (S), faixa etária (F), local (L) e estação de coleta (E). Dados incluem sumário do modelo, coeficientes para o nível 1 de cada parâmetro, valor de p [Pr(chi)] para cada parâmetro, calculado pelo teste de razão de verossimilhança (LRT), valor de AICc (Akaike Information Criteria),  $\Delta AICc$ , indicando a diferença entre AICc de modelo melhor ajustado e o modelo ‘cheio’, com todas os parâmetros incluídos, peso AICc, desvio e NPar, que indica números de parâmetros utilizados.

	Modelo	Coefficientes	Pr (Chi)	AICc	$\Delta AICc$	Peso AICc	Desvio	NPar
<b>PCBs</b>	PCBs~E+S	E Inverno: + S Macho: -	0,04* 0,01*	345,9	0,8	0,59	11,17	2
<b>DDTs</b>	DDTs~L+S+E	L ELP: + S Macho: - E Inverno: +	0,04* 0,04* 0,04*	269,4	0,6	0,57	13,2	3
<b>PBDEs</b>	PBDEs~S	S Macho: -	0,32	212,8	4,6	0,91	33,8	1
<b>Mirex</b>	Mirex~L+S	L ELP: - S Macho: -	0,04* 0,03*	213,7	3,1	0,83	14,7	2
<b>HCB</b>	HCB~L+S+E	L ELP: + S Macho: - E Inverno: +	0,08 0,06 0,03*	149,1	0,8	0,61	31,1	3
<b>Clordanas</b>	Clordanas~E	E Inverno: +	0,12	140,2	2,8	0,8	35	1

Além da influência de sexo, faixa etária, local e estação de coleta, para os indivíduos do CEL, também foi avaliada a correlação entre a área de concentração e os níveis de concentração de POPs totais. Uma correlação negativa, considerada moderada ( $r=-0,57$ ,  $p>0,05$ ), foi observada (Figura 10). Complementarmente, mapas construídos com base nestas áreas de concentração (Figura 11) evidenciam que indivíduos que se concentram em áreas menores tendem a fazê-lo em uma região específica do Complexo Estuarino em Laguna, na desembocadura do Rio Tubarão e adjacências.



**Figura 10:** Gráfico evidenciando a correlação entre valores de POPs totais bioacumulados (em ng g lipídeos<sup>-1</sup>) e área de concentração (Kernel 50%) em km<sup>2</sup>, para indivíduos amostrados no Complexo Estuarino de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/ SC (CEL).



**Figura 11:** Mapas de área de concentração (Kernel 50%) dos indivíduos do Complexo Estuarino Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim, Laguna/SC (CEL), ordenados de ‘A’ a ‘G’ em ordem crescente de concentração de POPs totais. A- LG4 (#46\*), B- LG5 (#48\*), C- LG2 (#J42\*), D- LG1 (#3\*), E- LG6 (#32\*), F- LG3 (#16\*), G- LG7 (#51\*). \*: Códigos de identificação individual conforme catálogo de Foto-ID (DAURA-JORGE; INGRAM; SIMÕES-LOPES, 2013).

A fim de elucidar as similaridades entre as amostras de acordo com variáveis ecológicas (categóricas - sexo, faixa etária, local de residência e estação em que foram coletadas as amostras) e químicas (quantitativas), bem como as relações entre variáveis ecológicas e os níveis de contaminantes, foi realizada uma análise fatorial para dados mistos (Factorial Analysis for Mixed Data - FAMD).

A FAMD extraiu três dimensões que explicam, respectivamente, 44, 22 e 14% da variância dos dados. Aproximadamente 66% da variância observada pode ser explicada pelas duas primeiras dimensões (dimensão 1 e dimensão 2) criadas pela FAMD (Tabela 5).

**Tabela 5:** Total de Variância (Eigenvalues), porcentagem de variância individual e cumulativa dos dados explicadas pelos fatores (Dim.1-5) criadas pela FAMD com base nas variáveis categóricas e quantitativas.

	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4	Dim.5
<b>Variância</b>	4,404	2,179	1,443	0,85	0,489
<b>% Variância</b>	44,037	21,789	14,434	8,498	4,888
<b>% Cumulativa de variância</b>	44,037	65,826	80,260	88,758	93,646

Todas as classes de contaminantes apresentam uma contribuição alta e positiva para a construção da dimensão 1. Para a construção da dimensão 2,  $\Sigma$ Pesticidas (DDTs, Clordanas e HCB),  $\Sigma$ DDT e Mirex apresentam uma contribuição alta [Valor de contribuição (Ctr): 21,617; 21,576 e 12,099 respectivamente) (Tabela 6), sendo os dois primeiros contribuições positivas (Coord: 0,686 para ambos), suportando uma relação positiva destes níveis com a dimensão 1, e o último uma contribuição negativa (Coord:-0,513), indicando uma correlação negativa deste nível com a dimensão 1 (Figura 12).

Para variáveis ecológicas (categóricas) como sexo, faixa etária, estação de coleta e local de coleta, foi observado que os níveis “fêmea”, “juvenil” e “inverno” compõem contribuições negativas à construção da dimensão 1 (Coord: -1,682; -1,253 e -0,718 respectivamente), indicando uma relação negativa das mesmas com esta dimensão. ‘Fêmea’ e ‘juvenil’ também representam os principais contribuintes para a construção da dimensão 1 (Ctr: 3,64 e 2,02, respectivamente). Os níveis “macho”, “adulto” e “inverno”, por sua vez, contribuem positivamente para a construção desta dimensão, suportando correlação positiva destes

níveis com a dimensão (Coord: 0,561; 0,418 e 0,923, respectivamente) (Tabela 7 e Figura 12).

Já para a dimensão 2, a variável “local”, em ambos os seus níveis (“CEL” e “ELP”), apresenta altos valores de contribuição para o eixo (Ctr: 18,602 e 14,468, respectivamente) (Tabela 6), sendo “CEL” uma contribuição positiva, suportando uma relação positiva deste nível com a dimensão 2 (Coord: 1,421), enquanto “ELP” representa uma contribuição negativa para a construção desta dimensão e, portanto, correlaciona-se negativamente com esta dimensão (Coord: -1,105) (Figura 12).

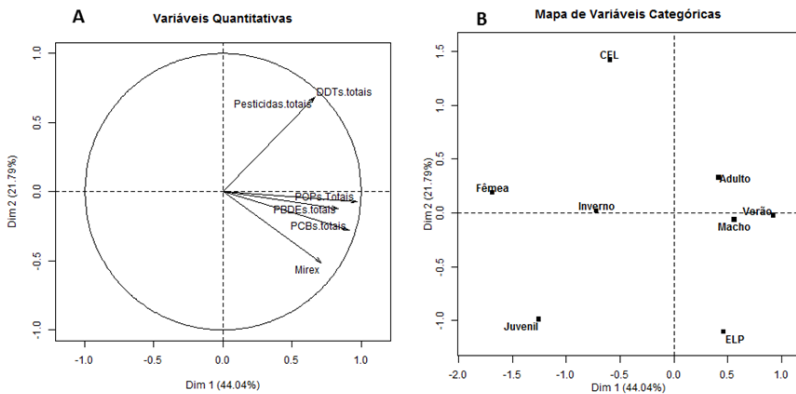
**Tabela 6:** Coordenadas (Coord) e contribuições relativas (Ctr) de cada classe de contaminante às duas primeiras dimensões de FAMD.

	Dimensão 1		Dimensão 2	
	Coord	Ctr	Coord	Ctr
<b>PCBs totais</b>	0,914	18,966	-0,281	3,612
<b>PBDEs totais</b>	0,834	15,783	-0,123	0,693
<b>DDTs totais</b>	0,667	10,099	0,686	21,576
<b>Mirex</b>	0,711	11,495	-0,513	12,099
<b>POPs totais</b>	0,968	21,297	-0,072	0,241
<b>Pesticidas totais</b>	0,663	9,976	0,686	21,617

**Tabela 7:** Coordenadas (Coord) e contribuições relativas (Ctr) de cada variável categórica às duas primeiras dimensões de FAMD.

	Dimensão 1		Dimensão 2	
	Coord	Ctr	Coord	Ctr
<b>CEL</b>	-0,592	0,791	1,421	18,602
<b>ELP</b>	0,461	0,615	-1,105	14,468
<b>Inverno</b>	-0,718	1,495	0,019	0,004
<b>Verão</b>	0,923	1,923	-0,024	0,006
<b>Fêmea</b>	-1,682	3,647	0,187	0,185
<b>Macho</b>	0,561	1,216	-0,062	0,062
<b>Adulto</b>	0,418	0,674	0,329	1,709
<b>Juvenil</b>	-1,253	2,023	-0,987	5,126

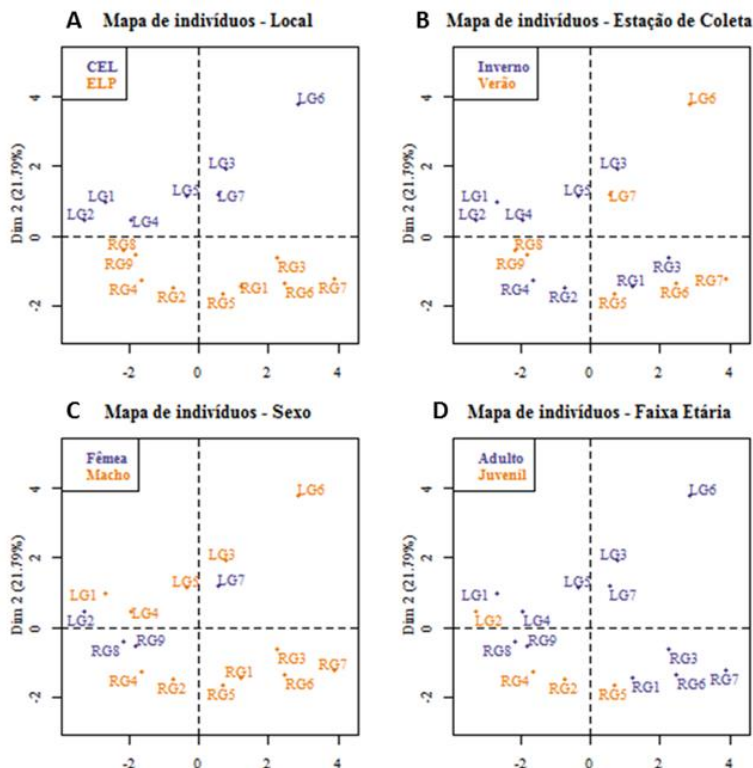




**Figura 12:** Orientação das variáveis quantitativas (classes de contaminantes) (A) e variáveis categóricas (sexo, faixa etária, local e estação de coleta) (B) em relação aos eixos das dimensões 1 e 2 da FAMD.

O posicionamento dos indivíduos nas dimensões 1 e 2 também permite visualizar a clara distinção entre aqueles provenientes da população do CEL e os oriundos da população do ELP. Indivíduos da população residente do CEL posicionam-se superiormente à dimensão 2, correlacionando-se positivamente à concentração de pesticidas totais e DDTs. Indivíduos da população residente do ELP, por sua vez, situam-se inferiormente ao eixo da dimensão 2, correlacionando-se mais fortemente às concentrações de Mirex e PCBs totais (Figura 13A).

Há uma tendência ao agrupamento entre amostras coletadas no verão, situadas em sua maioria à direita do eixo da dimensão 1, ou no inverno, que tendem a situar-se à esquerda do eixo. Esta relação, no entanto, é menos evidente que os demais agrupamentos (Figura 13B). Agrupamentos formados com base no sexo também podem ser observados, com fêmeas situando-se predominantemente à esquerda do eixo da dimensão 1, indicando uma tendência à correlação negativa entre fêmeas e a concentração de POPs em geral, e machos predominantemente situados à direita do mesmo eixo, correlacionados positivamente às classes de POPs (Figura 13C). Juvenis e adultos também parecem formar agrupamentos, com adultos posicionados majoritariamente à direita do eixo da dimensão 1 e juvenis, em sua maioria, posicionados à esquerda do mesmo eixo, indicando, respectivamente, correlação positiva e negativa às classes de POPs (Figura 13D).



**Figura 13:** Posicionamento dos indivíduos amostrados relativamente às dimensões 1 e 2 da FAMD, identificados com base no local (A), estação de coleta (B), sexo (C) e faixa etária (D).

### 3.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Utilizada para relativização das atividades enzimáticas, a concentração de proteínas totais das amostras variou de 2,13 a 4,15  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

Não foi possível avaliar a atividade catalítica de CYP1A, mensurada a partir da atividade EROD, uma vez que os valores obtidos foram abaixo do limite de detecção do método. Ensaios repetidos foram realizados com quantidades de 5 a 20  $\mu\text{L}$  de amostra, o que corresponde a 12 a 80  $\mu\text{g}$  de proteína total na reação. Foi possível identificar um

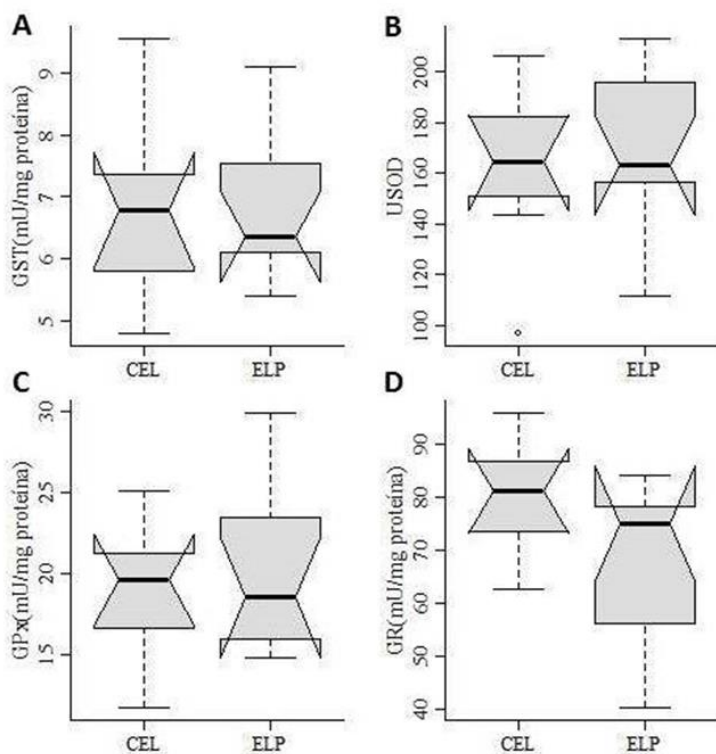
aumento nas taxas de formação de resorufina e na linearidade da reação com volumes maiores de amostra. No entanto, os valores encontrados ainda ficaram abaixo do limite de detecção do método. Não foram observados sinais de depleção de NADPH durante o ensaio. Também foram utilizadas amostras provenientes de tecido hepático de *Poecilia vivipara* como controle positivo do ensaio. Atividade EROD sempre foi mensurada nestas amostras controle.

Para determinação da atividade catalase (CAT), 3  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  e 20  $\mu\text{L}$  de amostra foram utilizados. Observou-se um aumento da linearidade e taxa de degradação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no ensaio que utilizou 20  $\mu\text{L}$  de amostra. No entanto, para todos os volumes, os valores de atividade ficaram abaixo do limite de detecção do método. Não foram observados sinais de depleção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Atividade CAT foi observada em amostras de tecido hepático de *Poecilia vivipara* submetidas às mesmas condições de ensaio e utilizadas como controle positivo do mesmo. Devido à ausência de valores de atividade acima do limite de detecção, EROD e CAT não foram incluídas nas análises posteriores.

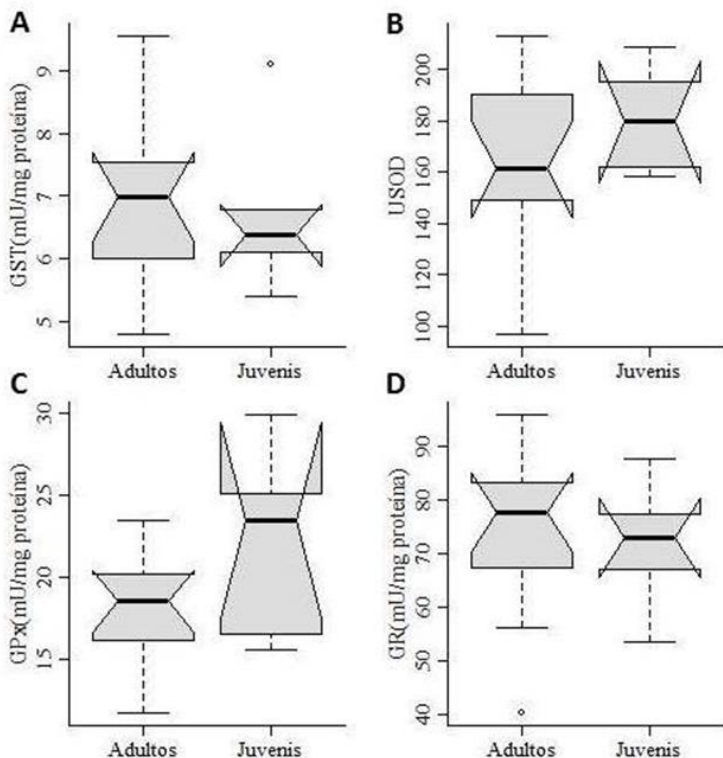
A atividade GST, SOD, GPx e GR foram comparadas entre os locais (Laguna – população do CEL; Rio Grande – população do ELP), sexo, faixa etária (adulto ou juvenil) e estação em que foram realizadas as coletas (inverno – junho a agosto ou verão- janeiro a março).

A variável ‘local’ não parece exercer influência sobre os valores de atividade média GST ( $t=-0,09$ ,  $df=10,23$ ,  $p=0,93$ ) (Figura 14A), SOD ( $t=-0,61$ ,  $df= 11,97$ ,  $p=0,55$ ) (Figura 14B) e GPx ( $t=-0,37$ ,  $df=15$ ,  $p=0,72$ ) (Figura 14C). A atividade média GR nos indivíduos amostrados da população de CEL foi maior que a obtida nos indivíduos amostrados da população de ELP. Tal diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa ( $t=1,80$ ,  $df=14,8$ ,  $p=0,09$ ) (Figura 14D).

‘Faixa etária’ também não exerce influência sobre atividade GST ( $W=33$ ,  $p=0,79$ ) (Figura 15A), SOD ( $t=-1,30$ ,  $df=12,22$ ,  $p=0,21$ ) (Figura 15B), GPx ( $t=-1,36$ ,  $df=5,03$ ,  $p=0,23$ ) (Figura 15C) ou GR ( $W=35$ ,  $p=0,64$ ) (Figura 15D).

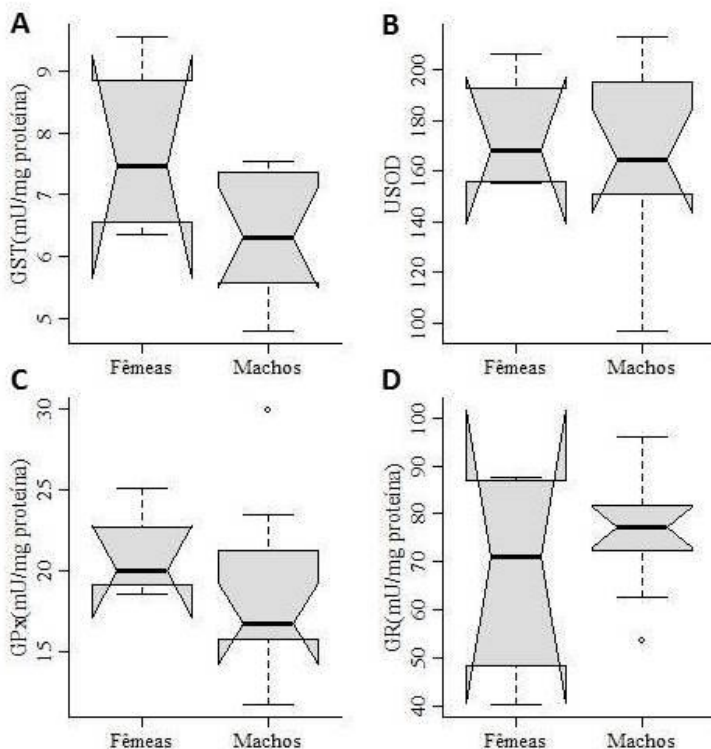


**Figura 14:** Boxplots da mediana de Glutathione *S*-Transferase (GST) (A), Superóxido Dismutase (SOD) (B), Glutathione Peroxidase (GPx) (C) e Glutathione Redutase (GR) (D) em botos amostrados no CEL e no ELP. Bigodes representam intervalo interquartil de 25 e 75% e entalhes indicam intervalo de confiança de 95%. Dados discrepantes identificados como pontos externos ao bigode.



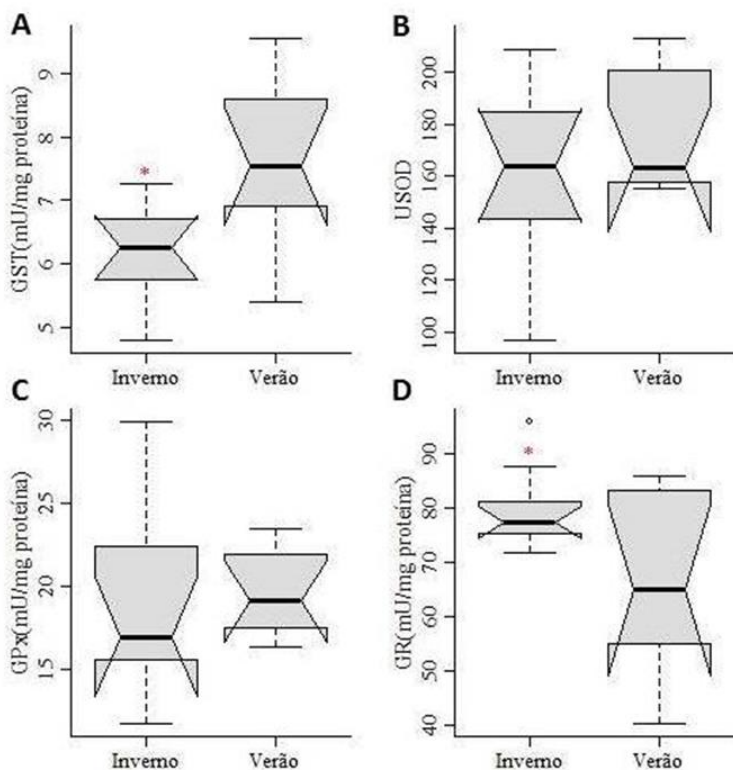
**Figura 15:** Boxplots da mediana de Glutaciona-S-Transferase (GST) (A), Superóxido Dismutase (SOD) (B), Glutaciona Peroxidase (GPx) (C) e Glutaciona Redutase (GR) (D) em botos Adultos e Juvenis. Bigodes representam intervalo interquartilico de 25 e 75% e entalhes indicam intervalo de confiança de 95%. Dados discrepantes identificados como pontos externos ao bigode.

Valores de atividade média GST, SOD ( $t=0,51$ ,  $df=8,12$ ,  $p=0,61$ ) (Figura 16B), GPx ( $t=1,17$ ,  $df=9,17$ ,  $p=0,26$ ) (Figura 16C) e GR ( $W=23$ ,  $p=0,95$ ) (Figura 16D) também foram estatisticamente similares em fêmeas e machos.



**Figura 16:** Boxplots da mediana de Glutathione *S*-Transferase (GST) (A), Superóxido Dismutase (SOD) (B), Glutathione Peroxidase (GPx) (C) e Glutathione Redutase (GR) (D) em botos Fêmeas e Machos. Bigodes representam intervalo interquartil de 25 e 75% e entalhes indicam intervalo de confiança de 95%. Dados discrepantes identificados como pontos externos ao bigode.

Apenas a variável ‘estação de coleta’ exerceu influência significativa sobre a atividade de enzimas antioxidantes, com valores significativamente menores de atividade GST em botos amostrados no inverno ( $W=11$ ,  $p=0,015$ ) (Figura 17A) e atividade média GR significativamente maior que amostras coletadas no verão ( $t = 2,15$ ,  $df = 15$ ,  $p= 0,04$ ) (Figura 17D).



**Figura 17:** Boxplots da mediana de Glutathione-S-Transferase (GST) (A), Superóxido Dismutase (SOD) (B), Glutathione Peroxidase (GPx) (C) e Glutathione Redutase (GR) (D) em botos amostrados no inverno e no verão. Bigodes representam intervalo interquartil de 25 e 75% e entalhes indicam intervalo de confiança de 95%. Dados discrepantes identificados como pontos externos ao bigode.  $*=p<0,05$ .

Estação do ano não parece exercer influência significativa sobre as atividades SOD ( $t=-1,06$ ,  $df=13,78$ ,  $p=0,30$ ) (Figura 17B) e GPx ( $t=0,19$ ,  $df=11,75$ ,  $p=0,84$ ) (Figura 17C).

A fim de identificar a relação direta entre a atividade das enzimas avaliadas e a concentração das classes de contaminantes foram realizadas análises de correlação, calculadas através do 'r' de Spearman, e testes de significância referentes aos valores de 'r' obtidos, apresentados na Tabela 8.

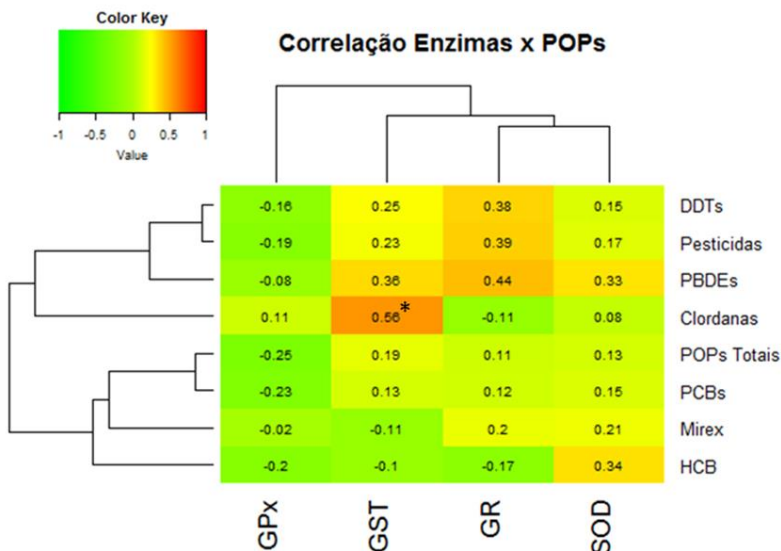
**Tabela 8:** Coeficientes de correlação ('r' de Spearman) entre níveis de classes de contaminantes e valores de atividade de glutatona *S*-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GR).

		<b>Coeficiente de Correlação (r)</b>	<b>p</b>
<b>ΣDDTs</b>	<b>GST</b>	0,247	0,338
	<b>GPx</b>	-0,164	0,529
	<b>SOD</b>	0,152	0,56
	<b>GR</b>	0,377	0,135
<b>ΣPCBs</b>	<b>GST</b>	0,132	0,612
	<b>GPx</b>	-0,225	0,384
	<b>SOD</b>	0,152	0,567
	<b>GR</b>	0,115	0,659
<b>ΣPBDEs</b>	<b>GST</b>	0,36	0,15
	<b>GPx</b>	-0,08	0,757
	<b>SOD</b>	0,33	0,194
	<b>GR</b>	0,438	0,07
<b>HCB</b>	<b>GST</b>	-0,09	0,712
	<b>GPx</b>	-0,198	0,445
	<b>SOD</b>	0,337	0,185
	<b>GR</b>	-0,168	0,517
<b>ΣClordanas</b>	<b>GST</b>	0,56	0,019*
	<b>GPx</b>	0,1	0,687
	<b>SOD</b>	0,084	0,747
	<b>GR</b>	-0,11	0,663
<b>Mirex</b>	<b>GST</b>	-0,107	0,68
	<b>GPx</b>	-0,022	0,93
	<b>SOD</b>	0,208	0,422
	<b>GR</b>	0,2	0,44
<b>Pesticidas Totais</b>	<b>GST</b>	0,232	0,368
	<b>GPx</b>	-0,19	0,462
	<b>SOD</b>	0,171	0,51
	<b>GR</b>	0,389	0,122
<b>POPs Totais</b>	<b>GST</b>	0,188	0,468
	<b>GPx</b>	-0,245	0,343
	<b>SOD</b>	0,129	0,619
	<b>GR</b>	0,112	0,666

\*Indica correlação significativa.



Os níveis e padrões de correlação obtidos podem ser melhor visualizados através do *Heat Map* (Figura 18).

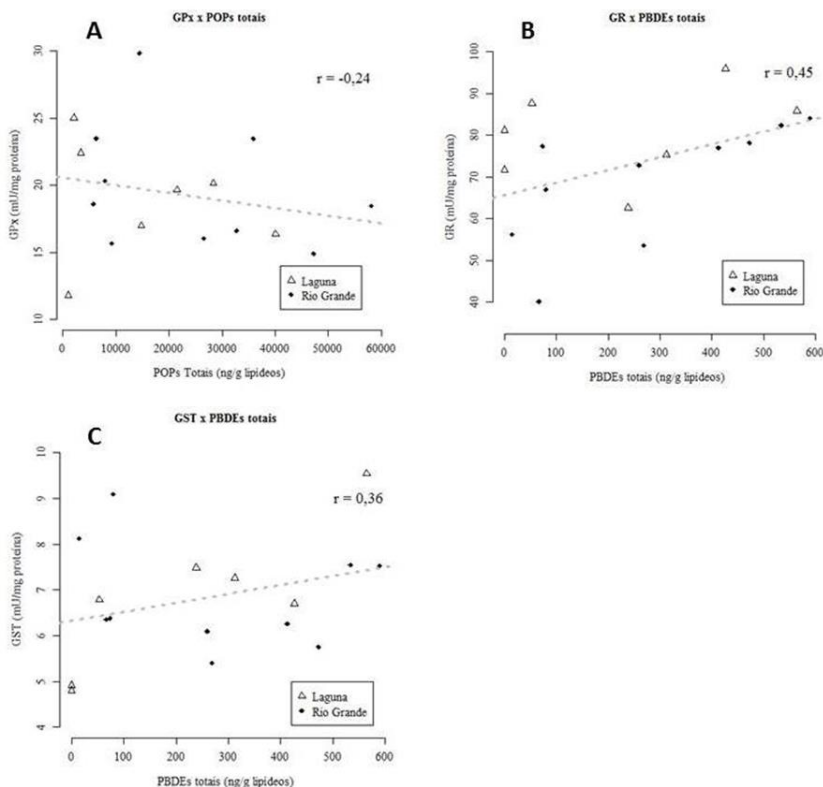


**Figura 18:** *Heat Map* retratando valores de correlação ( $r'$  de Spearman) entre valores de atividade enzimática (GST, GPx, GR e SOD) e níveis de concentração das distintas classes de contaminantes orgânicos. \* $p < 0,05$ . Dendogramas representam similaridades entre valor médio de linhas (POPs) e colunas (enzimas).

Não foi observado um padrão consistente de correlações entre os níveis de resposta de biomarcadores bioquímicos e as classes de contaminantes. GPx apresentou correlação negativa leve a moderada com todas as classes de contaminantes, especialmente quando consideramos o somatório de todos os POPs avaliados ( $r = -0,245$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 19A). A atividade de GR, por sua vez, apresenta correlações positivas moderadas a  $\sum$ DDTs ( $r = 0,377$ ,  $p > 0,05$ ), pesticidas totais ( $r = 0,389$ ,  $p > 0,05$ ) e  $\sum$ PBDEs ( $r = 0,438$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 19B), e parece ser a enzima cuja atividade é a mais impactada pela bioacumulação de POPs no tegumento dos botos.

$\sum$ PBDEs também se correlacionam positivamente às atividades de GST ( $r = 0,36$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 19C) e SOD ( $r = 0,33$ ,  $p > 0,05$ ). Atividade GST se correlacionou positivamente a  $\sum$ Clordanas ( $r = 0,56$ ,  $p < 0,05$ ), enquanto SOD apresentou correlação positiva com

concentrações de HCB ( $r=0,34$ ,  $p>0,05$ ). No entanto, correlações obtidas para estas duas classes de contaminantes devem ser interpretadas cuidadosamente, pois sua ocorrência em apenas algumas amostras pode ter enviesado os resultados de análises estatísticas e, portanto, podem ter culminado em índices de correlação superestimados.



**Figura 19:** Correlações ('r' de Spearman) entre atividade Glutaciona peroxidase (GPx) ( $\text{mU} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ) e concentração de POPs totais ( $\text{ng g lipídeos}^{-1}$ ) (A), Glutaciona Redutase (GR) ( $\text{mU} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ) e concentração de PBDEs ( $\text{ng g lipídeos}^{-1}$ ) (B) e atividade GST ( $\text{mU} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ) e a concentração de PBDEs ( $\text{ng g lipídeos}^{-1}$ ) (C).

### 3.3 BIOMARCADORES MOLECULARES

As curvas construídas para os genes *CYP1A*, *IFN- $\gamma$* , *IL-2* e *IL-17* não apresentaram linearidade e valores de eficiência satisfatórios, em

virtude de baixos níveis de transcrição dos mesmos. Por isso, tais genes foram excluídos da análise por qPCR do presente trabalho. Para os demais genes, as curvas apresentaram valores de eficiência entre 98 e 113% e de linearidade ( $R^2$ ) acima de 0,97. Dentre os possíveis genes referência avaliados, *RPS18* apresentou menor variação entre grupos e entre amostras, sendo, portanto, escolhido como normalizador para os cálculos de transcrição relativa dos genes *AHR*, *ARNT*, *GST*, *GPx*, *GR*, *IL1*, *MT2*, *MHCII*, *GAPDH* e *B-ACT*.

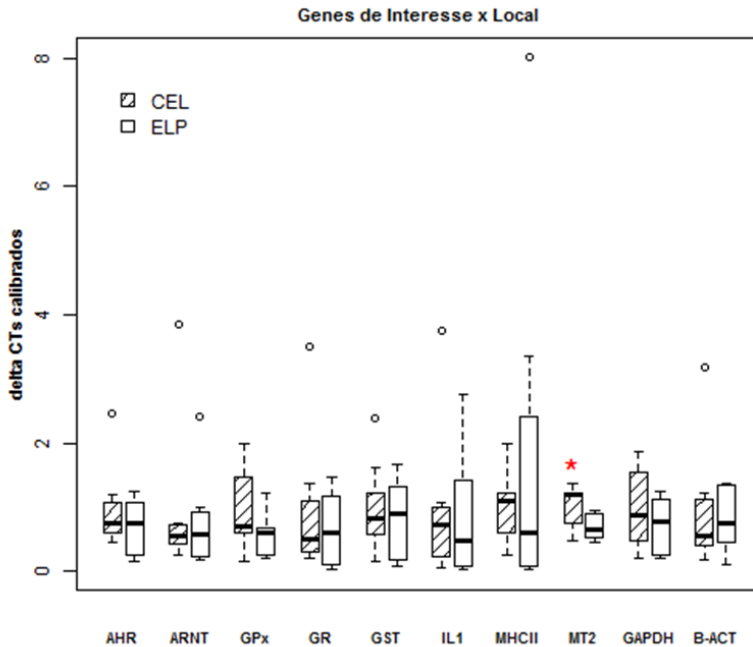
Os níveis de transcritos de *CYP1A* identificados em amostras tegumentares de botos foram muito baixos, sendo este gene, portanto, excluído do rol de biomarcadores moleculares avaliados.

A transcrição relativa dos genes alvo foi comparada entre grupos com base no local de amostragem (CEL; ELP), sexo, faixa etária (adulto ou juvenil) e estação do ano em que foram coletadas as amostras (inverno ou verão).

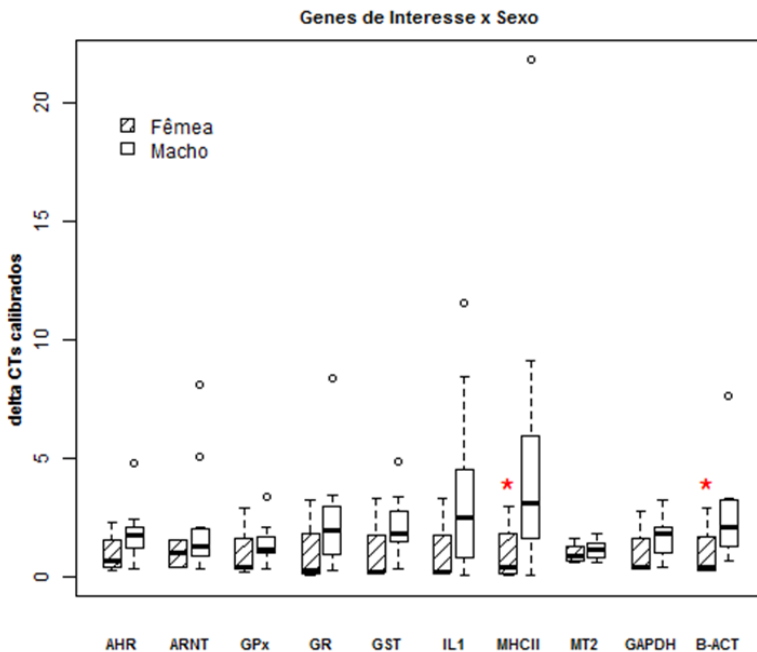
De maneira geral, não houve diferença nos níveis de transcritos dos genes entre os locais (Figura 20). Apenas o gene da isoforma 2 de Metalotioneína (*MT2*) diferiu significativamente entre os locais de amostragem, atingindo valor médio 1,5 vez maior em animais do CEL que em animais do ELP ( $w=55$ ,  $p=0,05$ ) (Figura 20).

Independentemente do local de amostragem, para a maioria dos genes analisados, não houve diferença significativa entre fêmeas e machos (Figura 21).

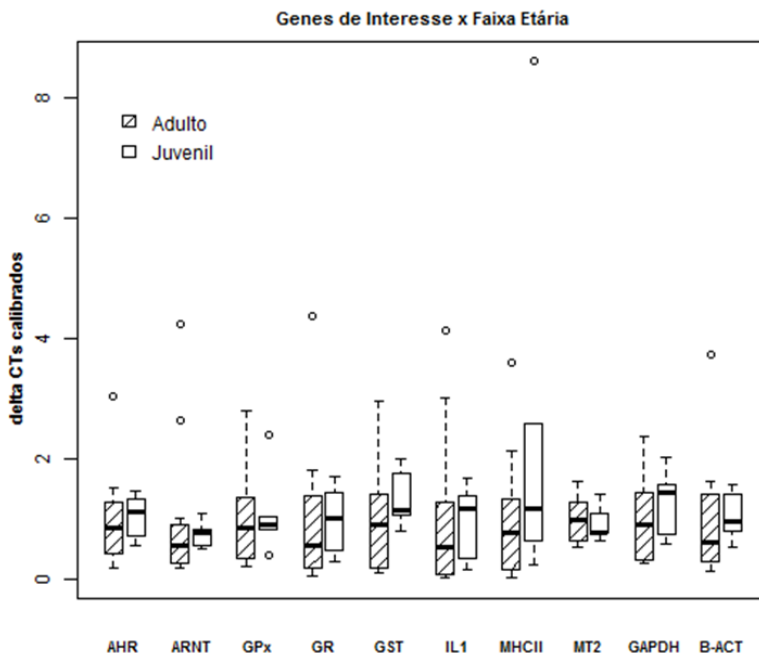
Os únicos genes que diferiram entre os sexos foram *MHCII* e *B-ACT*. Os níveis de transcritos de *MHCII* foram cinco vezes maiores em machos que em fêmeas ( $W=7$ ,  $p=0,04$ ), enquanto os níveis de transcritos de *B-ACT* foi 2,5 vezes mais elevada em machos que em fêmeas ( $W=8$ ,  $p=0,05$ ). Quando analisadas sob o viés de idade, não foram observadas diferenças significativas para nenhum dos genes estudados (Figura 22).



**Figura 20:** Níveis de transcrição relativa de *AHR*, *ARNT*, *GPX*, *GR*, *GST-pi*, *IL1*, *MHCII*, *MT2*, *GAPDH* e *B-ACT* em tecido epidérmico de *T. truncatus*. Valores representados como mediana e intervalo interquartilico. Transcrição relativa ao grupo de CEL. \* $p \leq 0,05$ .

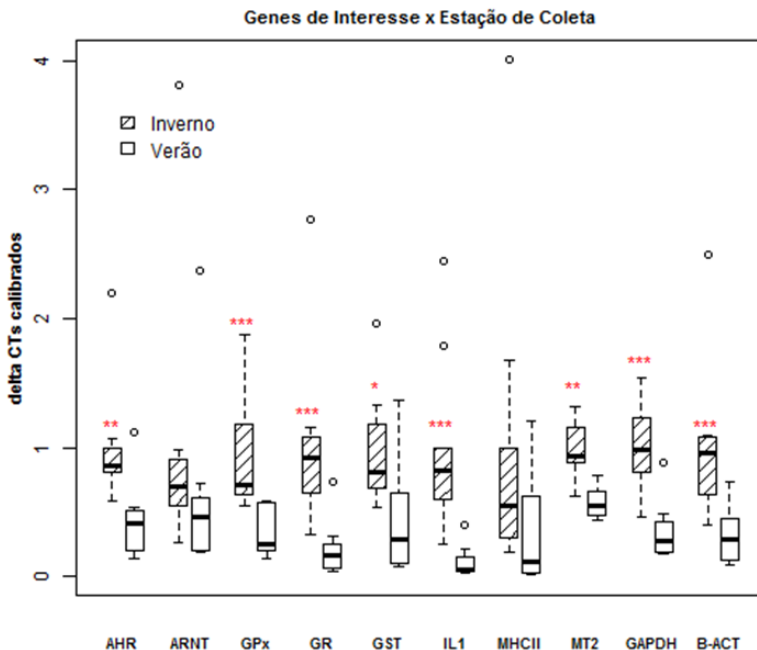


**Figura 21:** Níveis de transcrição relativa de *AHR*, *ARNT*, *GPX*, *GR*, *GST-pi*, *IL1*, *MHCII*, *MT2*, *GAPDH* e *B-ACT* em tecido epidérmico de *T. truncatus*. Valores representados como mediana e intervalo interquartílico. Transcrição relativa ao grupo ‘fêmeas’. \*  $p \leq 0,05$ .



**Figura 22:** Níveis de transcrição relativa de *AHR*, *ARNT*, *GPx*, *GR*, *GST-pi*, *IL1*, *MHCII*, *MT2*, *GAPDH* e *B-ACT* em tecido epidérmico de *T. truncatus*. Valores representados como mediana e intervalo interquartil. Transcrição relativa ao grupo ‘Adultos’. \* $p \leq 0,05$ .

Por fim, quando agrupados com base na estação do ano em que foram amostrados, os indivíduos apresentaram diferenças significativas na transcrição relativa para a maioria dos genes de interesse (Figura 23). Para estes genes de interesse, botos amostrados no inverno apresentaram níveis de transcrição relativa de duas a oito vezes maiores que aqueles amostrados no verão. *IL1* foi o gene que apresentou maior distinção sazonal, seguido dos genes de *GR*, *GPx*, *GAPDH* e *B-ACT*. *GST*, *AHR* e *MT2* apresentaram menor variação sazonal, embora os níveis de transcrição em botos amostrados no inverno ainda tenham sido significativamente maiores que em botos amostrados no verão. *ARNT* e *MHCII* foram os únicos genes a apresentarem valores médios de transcrição similares entre amostras coletadas no verão e no inverno, independentemente do local de amostragem.



**Figura 23:** Níveis de transcrição relativa de *AHR*, *ARNT*, *GPX*, *GR*, *GST-pi*, *IL1*, *MHCII*, *MT2*, *GAPDH* e *B-ACT* em tecido epidérmico de *T. truncatus*. Valores representados como mediana e intervalo interquartilico. Transcrição relativa ao grupo ‘inverno’ \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,005$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

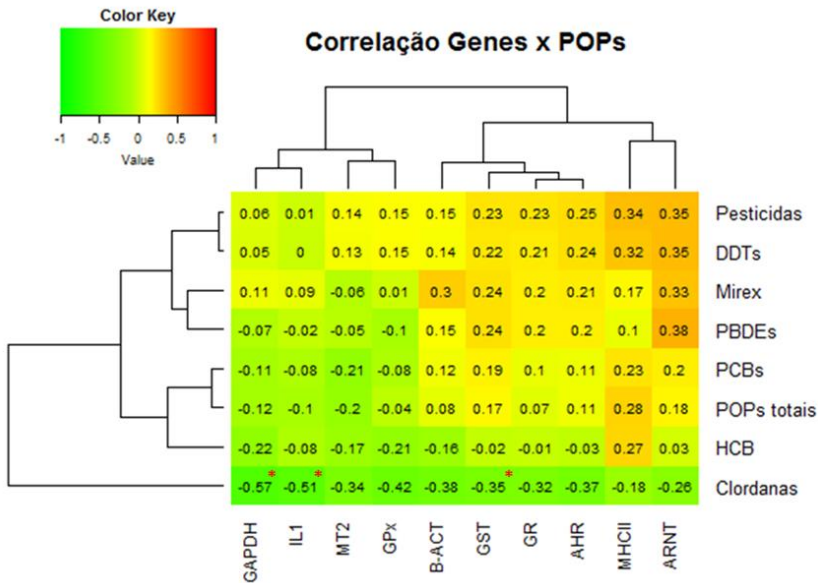
Para análise de correlação entre as diversas classes de POPs e os valores de expressão relativa dos genes de interesse foram calculadas o ‘r’ de Spearman para cada conjunto POPs x gene. Os resultados, sumarizados em um *Heat Map* (Figura 24), não permitem identificar um padrão consistente de correlações entre biomarcadores moleculares e distintas classes de contaminantes. *ARNT* apresentou os valores de correlação mais elevados dentre estes genes, especialmente com PBDEs, Pesticidas, DDTs e Mirex. *MHCII* correlacionou-se positivamente aos níveis de  $\Sigma$ Pesticidas, DDTs e POPs totais bioacumulados e *GST* apresentou uma correlação positiva com PBDEs considerada fraca.

Além destes três principais genes, *AHR* correlacionou-se fracamente a distintas classes de POPs. Similarmente, é possível identificar a existência de correlações positivas fracas entre *GR* e  $\Sigma$ Pesticidas, DDTs e PBDEs. *B-ACT* apresentou valores de correlação em geral fracos com  $\Sigma$ Pesticidas, DDTs, PBDEs, PCBs, POPs totais e

HCb. Apenas para Mirex foi identificado um valor de correlação fraco a moderado.

As correlações apontadas acima não foram estatisticamente significativas.

*GPX*, *MT2*, *IL1* e *GAPDH* não apresentaram correlação ou se correlacionaram negativamente às distintas classes de POPs bioacumulados. No entanto, foi observada a ocorrência de correlação negativa significativa entre *IL1*, *GAPDH* e *GST* com os níveis de clordanas bioacumuladas. Embora não estatisticamente significativos, valores moderados de correlação negativa foram obtidos entre os demais genes e as concentrações de clordanas.



**Figura 24:** Heat Map construído com base nos valores de ‘r de Spearman’, indicando a correlação entre as distintas classes de contaminantes e os genes de interesse avaliados. Dendogramas representam similaridade entre valor médio de linhas (POPs) e colunas (genes). \*p<0,05.

### 3.4 RELAÇÃO ENTRE CONTAMINANTES BIOACUMULADOS E VALORES DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES

Devido ao elevado número de variáveis e reduzido número amostral, duas análises de componentes principais (PCA) foram



realizadas. A primeira utilizou todas as classes de contaminantes bioacumulados e valores de resposta de biomarcadores bioquímicos e moleculares. Foram excluídas da análise POPs totais e pesticidas totais, que co-variaram com as demais classes de POPs.

Dos 16 eixos, foram retidos os quatro primeiros, que conjuntamente explicam 85% da variância dos dados. Os valores de contribuição de cada variável para a construção dos quatro principais eixos, sumarizados na Tabela 10, evidenciam a importância do biomarcadores moleculares para a construção do eixo 1. A atividade de GR também contribui significativamente para a construção deste eixo, assim como a concentração de clordanas e a atividade de GST, embora estas duas últimas situem-se negativamente ao eixo.

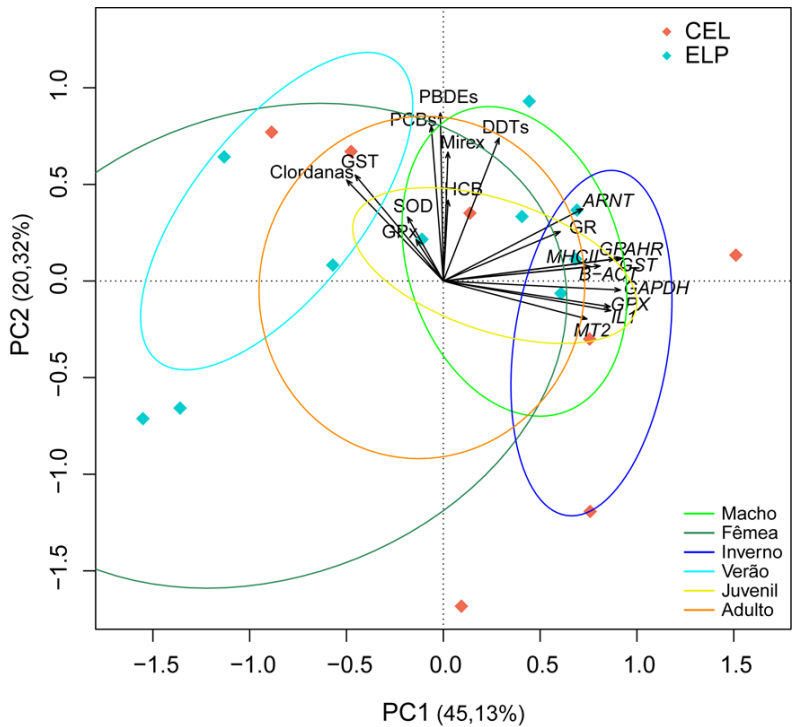
Para a construção do eixo 2, é possível destacar as contribuições de todas as classes de contaminantes, em especial as concentrações de PCBs, PBDEs, DDTs e Mirex. Os biomarcadores bioquímicos também contribuem significativamente com a construção deste eixo, em especial a atividade de GST. Dentre os biomarcadores moleculares, *ARNT* é o único que contribui significativamente para a construção deste eixo.

Para permitir a visualização da relação entre as variáveis incluídas nesta primeira análise resultados da PCA para os eixos 1 e 2 (Figura 25).

**Tabela 9:** Valores de contribuição (Loadings) de cada variável para a construção dos eixos 1-4 (PC1-PC4) da Análise de Componentes Principais (PCA).

	PC1	PC2	PC3	PC4
PCBs	-0,021	0,42	-0,142	-0,338
PBDEs	-0,005	0,456	-0,061	-0,037
Clordanas	-0,176	0,274	0,122	-0,022
DDTs	0,101	0,388	0,053	-0,207
HCB	0,009	0,219	0,566	0,034
Mirex	0,008	0,35	-0,457	-0,125
SOD	-0,065	0,174	0,411	0,368
At. GPx	-0,049	0,112	-0,37	0,506
At. GR	0,212	0,134	0,088	0,364
At. GST	-0,16	0,288	-0,013	0,382
AHR	0,322	0,061	0,037	0,049
ARNT	0,253	0,196	-0,053	0,132
GPx	0,303	-0,07	-0,044	-0,102
GR	0,325	0,062	0,015	0,061
GST	0,312	0,06	0,116	-0,013
IL1	0,305	-0,08	-0,01	0,062
MHCII	0,268	0,039	0,232	-0,275
MT2	0,261	-0,103	-0,182	0,195

<i>GAPDH</i>	0,322	-0,025	-0,077	0,04
<i>B-ACT</i>	0,285	0,041	-0,049	-0,002



**Figura 25:** Representação gráfica dos eixos 1 e 2 (PC1 e PC2) da análise de componentes principais (PCA), evidenciando o posicionamento de todas as variáveis e amostras em relação aos eixos. Indivíduos agrupados de acordo com sexo (machos e fêmeas), faixa etária (juvenil ou adulto) e estação do ano em que foram amostrados (verão e inverno). Elipses representam intervalo de confiança de 95% para variância populacional.

Com base nos agrupamentos entre variáveis (Figura 25), foi realizada uma segunda PCA com apenas cinco variáveis (PBDEs, DDTs, atividade GST e níveis de transcrição de ARNT e GAPDH), consideradas representativas das demais variáveis.

Especificamente, PBDEs foi utilizada como variável representativa de PCBs, Mirex e HCB. GST foi utilizada como variável representativa de clordanas, SOD e GPx. ARNT representa a variação de GR, enquanto GAPDH foi utilizada como variável representativa de GR,

*AHR*, *MHCII*, *B-ACT*, *GPx*, *IL-1* e *MT2*. Desta forma, resultados provenientes da segunda PCA podem ser extrapolados para as variáveis não utilizadas na análise.

A segunda PCA extraiu cinco eixos. Os dois primeiros, que foram retidos, explicam conjuntamente 80% da variância dos dados. Valores de contribuição de cada variável para a construção dos eixos 1 e 2, representados na tabela 11, permitem inferir sobre a correlação entre as variáveis utilizadas.

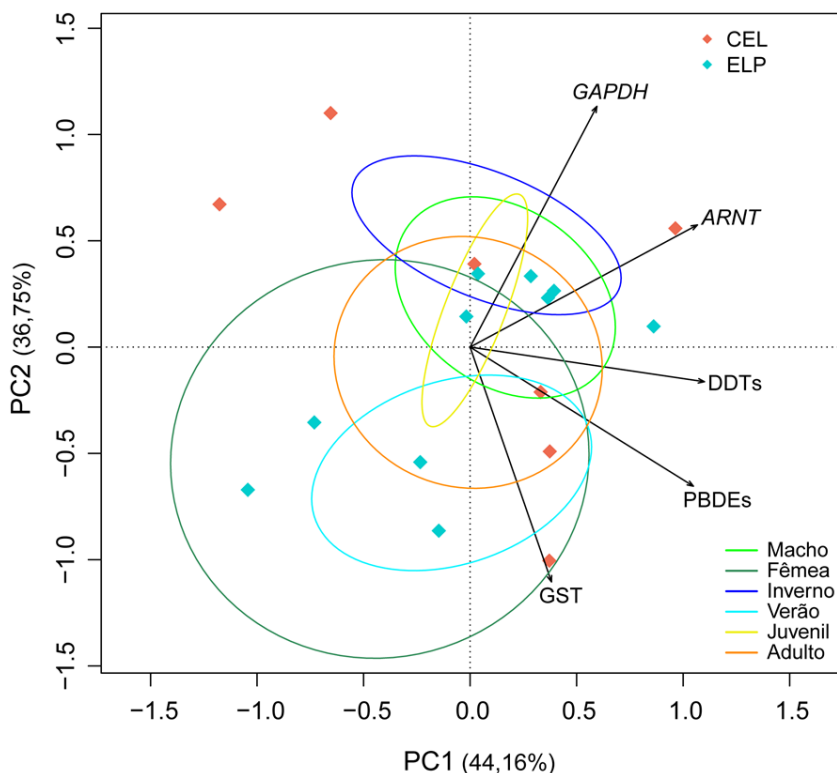
PBDEs, DDTs e *ARNT* apresentam os maiores valores de contribuição, todas positivas, para a construção do eixo 1. Este resultado indica correlação positiva entre estas variáveis.

**Tabela 10:** Valores de contribuição (Loadings) de cada variável para a construção dos eixos 1 e 2 (PC1-PC2) da segunda análise de componentes principais (PCA), construída com base apenas em cinco variáveis representativas (PBDEs, DDTs, GST, *ARNT* e *GAPDH*).

	PBDEs	DDTs	GST	<i>ARNT</i>	<i>GAPDH</i>
<b>PC1</b>	1.0484	1.1004	0.3822	1.0672	0.5954
<b>PC2</b>	- 0.6544	-0.1630	-1.1044	0.5746	1.1325

Paralelamente, para a construção do eixo 2, GST, PBDEs e DDTs apresentam contribuições negativas à construção do eixo, suportando a existência de correlação entre estas variáveis, especialmente entre GST e PBDEs, cujos valores de contribuição são maiores que aquele observado para DDTs. *ARNT* e *GAPDH*, por sua vez, apresentam valores de contribuição positivos à construção do eixo 2 o que indica correlação negativa entre estas variáveis e PBDEs e GST. Correlação negativa é principalmente observada para *GAPDH*, cujo valor de contribuição para o eixo 2 é o maior dentre os obtidos para todas as variáveis.

A relação entre variáveis também pode ser observada na figura 26.



**Figura 26:** Representação gráfica dos eixos 1 e 2 (PC1 e PC2) da análise de componentes principais (PCA), evidenciando o posicionamento das variáveis representativas (PBDEs, DDTs, GST, *ARNT* e *GAPDH*) e amostras em relação aos eixos. Indivíduos agrupados de acordo com sexo (machos e fêmeas), faixa etária (juvenil ou adulto) e estação do ano em que foram amostrados (verão e inverno). Elipses representam intervalo de confiança de 95% para variância populacional.

Em ambas as representações gráficas das PCAs, agrupamentos formados com base na faixa etária dos indivíduos (adultos e juvenis) não puderam ser claramente separados, assim como aqueles formados para local de amostragem (CEL e ELP) e sexo (Machos e Fêmeas).

No entanto, ficam evidentes agrupamentos de amostras coletadas no inverno e no verão, suportando a existência de distintos perfis de contaminação e de padrão de resposta de biomarcadores entre estes grupos.

## 4 DISCUSSÃO

De modo geral, o presente trabalho encontrou níveis moderados de POPs nos botos amostrados, comparativamente aos dados da literatura para delfínídeos (Tabela 11). Também foi possível identificar uma maior relevância do aporte de pesticidas no quadro de contaminação do Complexo Estuarino de Laguna em comparação ao estuário da Lagoa dos Patos, onde predominaram POPs de origem industrial, e uma influência significativa de variáveis ecológicas, como sexo, faixa etária, estação de coleta e, para os botos de CEL, área de concentração de vida, sobre as concentrações de POPs bioacumulados.

Para a maioria dos biomarcadores avaliados, não foi observada distinção entre os valores de resposta para botos de CEL e ELP. Também não foram observados padrões claros de correlação entre as concentrações de classes de POPs e valores de resposta dos biomarcadores mensurados, embora alguns biomarcadores tenham se agrupado aos contaminantes na PCA. A ausência de um padrão claro de correlação pode ser decorrente da influência exercida por variáveis ecológicas, especialmente sexo e estação do ano em que foram realizadas as coletas sobre o valor de resposta de biomarcadores.

No que se refere aos níveis de contaminantes bioacumulados obtidos pelo presente trabalho, os valores de POPs bioacumulados, apesar de abaixo de valores obtidos em cetáceos de ambientes aquáticos poluídos, como o Mar Mediterrâneo (ADAMS et al., 2014; BERROW et al., 2002; BORRELL et al., 2006; FAIR et al., 2010; HANSEN et al., 2004) (Tabela 11), são similares àqueles obtidos pela maioria dos estudos realizados na costa brasileira (ALONSO, 2008; LEONEL et al., 2012; MÉNDEZ-FERNANDEZ et al., 2016; YOGUI et al., 2010; YOGUI; DE OLIVEIRA SANTOS; MONTONE, 2003) (Tabela 11). Os elevados níveis de  $\Sigma$ DDTs mensurados em botos cinza residentes do Complexo de Cananéia, no Paraná, uma região historicamente dedicada à agricultura constituem uma exceção, sendo amplamente maiores que os demais registros deste composto em botos da costa brasileira (YOGUI; DE OLIVEIRA SANTOS; MONTONE, 2003) (Tabela 11).

Assim como em outros estudos realizados na costa brasileira, os níveis de clordanas e HCB em botos do Complexo Estuarino de Laguna e do Estuário da Lagoa dos Patos são inferiores aqueles usualmente identificados em áreas altamente impactadas por atividade agrícolas (BERROW et al., 2002; ISOBE et al., 2009), embora alguns estudos com cetáceos de regiões industrializadas da Europa e América do Norte

tenham reportado níveis similarmente baixos destes compostos (FAIR et al., 2010; FOSSI et al., 2004; YOGUI; DE OLIVEIRA SANTOS; MONTONE, 2003). Os baixos níveis de HCB encontrados no presente estudo reforçam o papel secundário deste composto na contaminação de áreas tropicais (TANABE et al., 1993), em decorrência do menor uso deste composto nestas áreas e da sua maior volatilidade, que facilita sua dispersão atmosférica e previne que o mesmo concentre-se em ambientes costeiros (BENGTSON NASH; WAUGH; SCHLABACH, 2013). Níveis reduzidos de HCB também podem ser decorrentes da alta afinidade deste composto por partículas orgânicas, o que favorece sua adsorção no sedimento, tornando-o menos disponível para a biota aquática (BECK; HANSEN, 1974). Além de sua utilização como fungicida, os níveis encontrados também podem ser oriundos de queima de resíduos urbanos (AHLING; LINDSKOG, 1978).

Os valores de  $\Sigma$ PBDEs identificados neste estudo também são menores que os níveis considerados elevados para *Tursiops truncatus* de regiões industrializadas dos EUA e do Mediterrâneo (ADAMS et al., 2014; BARÓN et al., 2015) (Tabela 11). Embora se encontrem abaixo do limite de risco para PBDEs, estabelecido em 1500 ng g lípidos<sup>-1</sup> (BARÓN et al., 2015), as concentrações obtidas neste estudo podem ser consideradas moderadas, situando-se entre os níveis baixos e mais elevados obtidos para cetáceos da costa brasileira (LEONEL et al., 2012; MÉNDEZ-FERNANDEZ et al., 2016; YOGUI et al., 2011) (Tabela 11).

Destoando do padrão dos demais contaminantes, os valores de Mirex obtidos, especialmente para as amostras do ELP, podem ser considerados elevados quando comparados a dados obtidos para cetáceos da América Latina e de regiões industrializadas dos EUA (FAIR et al., 2010; HANSEN et al., 2004; LEONEL et al., 2012; YOGUI; DE OLIVEIRA SANTOS; MONTONE, 2003). Contudo, como este composto não foi analisado em grande parte dos trabalhos disponíveis na literatura, os níveis aqui discutidos podem não ser representativos do real panorama de contaminação global por Mirex.

**Tabela 11:** Concentração média (ng g lipídeos<sup>-1</sup>) de  $\Sigma$ PCBs,  $\Sigma$ DDTs, Mirex, HCB,  $\Sigma$ CHLs e  $\Sigma$ PBDEs, em amostras lipídicas de distintas espécies de delfínídeos, obtidas através de necrópsia ou biópsia.

				Média (ng g lipídeo <sup>-1</sup> )						
Espécie e Local	Ano	Sexo	Método de coleta	ΣPCBs	ΣDDTs	Mirex	HCB	ΣCHLs	ΣPBDEs	Referência
<i>Tursiops truncatus</i>										
Brasil – CEL	2016	F/M	Biópsia	10092	5304	158	50	49,8	228	Este trabalho
Brasil - ELP	2016	F/M	Biópsia	21560	2227	308	28	45,7	277	Este trabalho
Brasil – São Paulo	2010	M	Necrópsia	5910	2420	94	80	38	64 <sup>a</sup>	Yogui et al., 2010
Brasil - RJ	2012	M	Necrópsia	11800	5000	-	290	-	-	Lailson-Brito et al., 2012
US – Charleston	2010	M	Biópsia	77500	23892	843	116,8	8557	-	Fair et al., 2010
US – IRL	2010	M	Biópsia	66578	15357	198	22,5	6034	-	Fair et al., 2010
US - Beaufort	2004	M	Biópsia	53276	51906	508	36	7022	-	Hansen et al., 2004
US - Charleston	2014	M	Biópsia	76600	26200	-	-	-	5970	Adams et al., 2014
Irlanda	2002	F/M	Biópsia	23900	16000 <sup>b</sup>	-	233	3,5 <sup>c</sup>	-	Berrow et al., 2002
Golfo do México <sup>d</sup>	2012	M	Biópsia	45667	26533	-	-	2720	1000	Wilson et al., 2012
Golfo do México <sup>d</sup>	2012	F	Biópsia	10406	4312	-	-	490	337	Wilson et al., 2012
Cádiz	2015	-	Biópsia	-	-	-	-	-	206	Barón et al., 2015
Gibraltar	2015	-	Biópsia	-	-	-	-	-	1184	Barón et al., 2015
Catalonia	2006	F/M	Biópsia	161000	52000	-	-	-	-	Borrell et al., 2006
Valência	2006	F/M	Biópsia	174000	66000	-	-	-	-	Borrell et al., 2006
Portugal	2006	F/M	Biópsia	75000	31000	-	-	-	-	Borrell et al., 2006

<b>India</b>	1993	F/M	Necrópsia	10507	746,4	-	11,8	-	-	Tanabe et al., 1993
<b><i>Sotalia guianensis</i></b>										
<b>Brasil – Cananéia</b>	2003	F/M	Necrópsia	4610	35900	151	15	23,5	-	Yogui et al., 2003
<b>Brasil – Sudeste</b>	2004	F/M	Necrópsia	17780	27230	-	34	237,7	-	Kajiware et al., 2004
<b>Brasil – São Paulo</b>	2010	M	Necrópsia	1970	5870	46	67	14	59 <sup>a</sup>	Yogui et al., 2010
<b>Brasil – Ceará</b>	2014	F/M	Necrópsia	7350	1100	90	7	-	-	Santos-neto et al., 2014
<b>Brasil – Guanabara RJ</b>	2010	F/M	Necrópsia	34810	7953	-	46	-	-	Lailson-Brito et al., 2010
<b>Brasil – Ilha Grande</b>	2010	F/M	Necrópsia	12294	3863	-	29	-	-	Lailson-Brito et al., 2010
<b>Brasil - Paranagua</b>	2010	F/M	Necrópsia	4564	5757	-	41	-	-	Lailson-Brito et al., 2010
<b><i>Delphinus sp</i></b>										
<b>Argentina</b>	2016	M	Necrópsia	5916	3576	121	184	-	-	Durante et al., 2016
<b>Brasil - Sudeste</b>	2004	M	Necrópsia	17000	11000	-	32	200	-	Kajiware et al., 2004
<b>Brasil - RJ</b>	2012	F/M	Necrópsia	8400	2400	-	40	-	-	Lailson-Brito et al., 2012
<b>Espanha</b>	2006	F/M	Necrópsia	15190	3953	-	-	-	-	Tornero et al., 2006
<b>Nova Zelândia<sup>e</sup></b>	2007	F/M	Necrópsia	1001	2237	-	36	40,9	-	Stockin et al., 2007
<b><i>Stenella sp</i></b>										
<b>Brasil - sudeste</b>	2004	M	Necrópsia	59000	36500	-	77	675	-	Kajiware et al., 2004
<b>Brasil - sudeste</b>	2016	F/M	Necrópsia	21500	7900	450	58	18	580	Méndez-Fernández, 2016



<b>Brasil – São Paulo</b>	2010	M	Necrópsia	19300	31700	393	113	5	-	Yogui et al., 2010
<b>Brasil – São Paulo</b>	2012	F/M	Necrópsia	10453	2785	263	22	10,6	629	Leonel et al., 2012
<b>Itália - Mediterrâneo</b>	2004	-	Biópsia	13233	10043	-	73	-	-	Fossi et al., 2004
<b>Japão</b>	2009	M	Necrópsia	24343	62880	-	538	6372	540	Isobe et al., 2009

***Pontoporia  
blainvillei***

<b>Brasil – Sudeste<sup>f</sup></b>	2004	M	Necrópsia	3100	4262	-	11	47,5	-	Kajiwara et al., 2004
<b>Brasil – São Paulo<sup>f</sup></b>	2008	M	Necrópsia	9920,5	2325	67,65	24,7	26,85	-	Alonso et al., 2008
<b>Brasil – São Paulo</b>	2010	M	Necrópsia	5590	3080	63	54	3	60,3 <sup>a</sup>	Yogui et al., 2010
<b>Brasil - Sudeste</b>	2011	F/M	Necrópsia	3017	1545	-	33,7	-	-	Lailson-Brito et al., 2011

<sup>a</sup>: Dados obtidos de Yogui et al. (2011). Amostras obtidas dos mesmos animais analisados em Yogui et al. (2010).

<sup>b</sup>: Concentração de p,p'DDE.

<sup>c</sup>:  $\Sigma$ CHLs calculados pela somatória de *trans*-nonaclor e *trans*-clordano.

<sup>d</sup>: Valores originais em ng g peso úmido<sup>-1</sup>. Convertidos a ng g lipídeos<sup>-1</sup> a partir de % lipídica, fornecidos pelos autores.

<sup>e</sup>: Dados originais em µg Kg peso úmido<sup>-1</sup>. Convertidos a ng g lipídeos<sup>-1</sup> a partir da % lipídica e massa original utilizada, ambos fornecidos pelos autores.

<sup>f</sup>: Médias calculadas a partir dos valores obtidos para machos maduros e imaturos, conforme disponibilizado pelos autores.

-: Concentrações não determinadas pelo estudo

Embora classicamente classificado como pesticida, as concentrações de Mirex mensuradas no presente trabalho estão possivelmente associadas à sua utilização como retardante de chama (NCBI, 2016b), tendo em vista que cultivos de cana-de-açúcar ou plantações de eucalipto, as principais culturas que utilizam Mirex como formicida no Brasil, não ocorrem em nenhuma das localidades amostradas (LOPEZ et al., 2013). Neste sentido, os valores de Mirex significativamente mais elevados obtidos para os botos do ELP podem indicar um significativo aporte de contaminantes de origem industrial no estuário, como observado para outras regiões industrializadas (SUN et al., 2013).

Concentrações de PCBs obtidas reforçam este perfil. Devido à sua utilização como isolantes térmicos em equipamentos elétricos, hidráulicos, bem como na formulação de tintas, pigmentos e borrachas, os PCBs são indicadores de contaminação por atividades industriais (BREIVIK et al., 2004). Níveis de PCBs bioacumulados nos botos de ELP, quase duas vezes mais elevados que em botos do CEL, são semelhantes aos níveis observados em cetáceos de regiões desenvolvidas do sudeste do Brasil, como Rio de Janeiro e São Paulo (KAJIWARA et al., 2004; LAILSON-BRITO et al., 2010; MÉNDEZ-FERNANDEZ et al., 2016; YOGUI et al., 2010) e mais elevadas que aqueles identificados cetáceos de regiões industrializadas do globo, como Japão, Irlanda e alguns locais do Mediterrâneo (BERROW et al., 2002; FOSSI et al., 2004; ISOBE et al., 2009).

Apesar de estarem abaixo dos valores considerados extremamente altos obtidos em regiões intensamente antropizadas da Europa e América do Norte (ADAMS et al., 2014; BORRELL et al., 2006), as concentrações médias de PCBs dos botos do estuário da Lagoa dos Patos estão acima do valor de  $14,8 \mu\text{g g lipídeo}^{-1}$  proposto por Schwacke (2002) para *T. truncatus* como um limite a partir do qual há um incremento de 10% de risco (mortalidade, reprodutivo, etc) para o indivíduo. Este resultado reforça o impacto associado à contaminação proveniente de atividade industrial sobre esta população residente.

Comparativamente, os níveis de  $\Sigma\text{PCBs}$  quantificados nos botos do CEL são menores que aqueles mensurados em botos do ELP e outros delfínídeos provenientes de locais industrializados (Tabela 11). No entanto, os níveis identificados em *T. truncatus* e outros odontocetos em localidades menos desenvolvidas da América do Sul (DURANTE et al., 2016; LEONEL et al., 2012; SANTOS-NETO et al., 2014; YOGUI et al., 2010) são ainda menores que os mensurados para botos de CEL.

Estes dados suportam que botos do CEL estão expostos a POPs de origem industrial, ainda que estes representem um menor impacto sobre esta população que outras fontes, como as agrícolas.

Apesar das distinções em termos de concentrações, padrões de prevalência de congêneros de PCBs obtidos foram similares entre botos amostrados e estão de acordo com dados da literatura. Congêneros mais pesados (hexa, penta e heptaclorobifenilas) foram predominantes, um padrão atribuído à menor dispersão atmosférica destes compostos (BROWN et al., 2014), o que facilita sua deposição no ambiente costeiro e, conseqüentemente, sua bioacumulação ao longo da rede trófica de ambientes costeiros. Congêneros pouco clorados são usualmente associados à ingestão de presas oceânicas, que estão expostas a congêneros mais voláteis, transportados atmosféricamente de suas origens costeiras (HANSEN et al., 2004). Tendo em vista o perfil costeiro de ambas as populações amostradas neste estudo, as menores concentrações de congêneros leves encontradas estão de acordo com esta premissa. Além da volatilidade diferenciada, o acúmulo de congêneros mais clorados de PCBs em cetáceos também pode estar relacionado a menor capacidade de detoxificação destes compostos por cetáceos, especialmente em decorrência de uma reduzida atividade de CYP450 da subfamília 2B, principais responsáveis pela detoxificação destes congêneros (BOON et al., 1997; TANABE et al., 1988).

Assim como para PCBs, o padrão de pesticidas encontrado é consistente com a ampla maioria dos trabalhos com pequenos cetáceos, sendo o grupo de DDTs o pesticida mais representativo. Dentre seus isômeros, DDE é o principal, em decorrência da rápida declorinação parcial de DDT a DDE, em uma reação dependente de GSH, catalisada pela DDT declorinase (WALKER, 1995). Analisando os dois isômeros presentes na mistura comercial p,p'-DDT e o,p'-DDT e seus metabólitos, é possível observar que, enquanto o primeiro parece ser facilmente metabolizado a p,p'-DDE e p,p'-DDD, confirmando a eficiência deste processo de metabolização, o mesmo não ocorre com o,p'-DDT, que continua sendo prevalente sobre seus metabólitos o,p'-DDE e o,p'-DDD. O padrão, similar ao obtido por outros trabalhos (FOSSI; MARSILI, 2003; KARUPPIAH; SUBRAMANIAN; OBBARD, 2005; YOGUI et al., 2010), indica a ausência de um aparato enzimático capaz de rapidamente metabolizar este isômero em cetáceos, ainda que estudos prévios sugiram que o,p'-DDT seja declorado de maneira similar a p,p'-DDT em mamíferos e aves (HASSALL; MANNING, 1972; KITAMURA et al., 2002).

Em valores absolutos, as concentrações de  $\sum$ DDTs mensuradas no presente trabalho estão abaixo daquelas quantificadas em cetáceos de regiões impactadas por atividade agrícolas (ADAMS et al., 2014; BERROW et al., 2002; BORRELL et al., 2006; HANSEN et al., 2004; YOGUI; DE OLIVEIRA SANTOS; MONTONE, 2003) (Tabela 11). No entanto, níveis significativamente mais elevados de  $\sum$ DDTs, comparativamente a botos do ELP, suportam uma maior relevância do aporte de POPs oriundos de fontes agrícolas para o quadro de contaminação dos botos de CEL. Valores significativamente maiores da razão  $\sum$ DDTs/ $\sum$ PCBs em botos de CEL reforçam esta distinção. Borrell (2006) e Adams (2014) sugerem utilizar esta razão para comparação entre indivíduos provenientes de áreas distintas. Embora a mesma não indique os níveis de contaminação, ela reflete o perfil de contaminação do local, sendo que valores mais elevados evidenciam uma maior contribuição de contaminantes agrícolas, enquanto razões baixas indicam aporte majoritário de resíduos industriais. A distinção no perfil de POPs entre o Complexo Estuarino de Laguna (CEL) e o Estuário da Lagoa dos Patos (ELP) também fica evidente na representação gráfica da FAMD, na qual o nível ‘CEL’ correlaciona-se positivamente às concentrações de  $\sum$ Pesticidas e DDTs totais, enquanto o nível ‘ELP’ correlaciona-se negativamente a estas variáveis e positivamente aos níveis de Mirex.

Todos estes resultados indicam a relevância de fontes agrícolas de contaminantes orgânicos no quadro de contaminação atual do CEL e reforçam a insignificância histórica destas fontes de contaminação para ELP. Vale ressaltar que a persistência e amplo uso de DDTs, assim como PCBs, tornaram-nos contaminantes ubíquos, de modo que não é possível descartar a hipótese de que os valores aqui reportados para ambas as classes sejam devidos, em parte, à uma origem difusa.

No entanto, embora DDTs tenham sido banidos no final da década de 90, é possível que os mesmos tenham sido oriundos da prática de rizicultura, extensivamente desenvolvida na bacia do Rio Tubarão. Esta prática pode, ainda hoje, atuar como fonte de contaminação do CEL por pesticidas ainda em uso, como carbofuran e quinclorac (RESGALLA et al., 2007; SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE RECURSOS HÍDRICOS DE SANTA CATARINA, 1998; VIEIRA et al., 2016).

A relevância do rio Tubarão como fonte de contaminantes é também suportada pela correlação negativa obtida para o tamanho do uso de área de botos do CEL e os níveis de POPs totais bioacumulados

pelos mesmos. Este resultado evidencia que animais que concentram suas atividades em áreas pequenas, próximas à boca do Rio Tubarão e no canal que liga CEL ao mar, estão expostos ao maior aporte de POPs.

O rio Tubarão drena uma região que abarca não apenas a prática de rizicultura, mas um pólo de exploração e refinaria de carvão e pontos de esgotamento urbano, especialmente da cidade de Tubarão (MUÑOZ; BORTOLUZZI, 2000; OSÓRIO et al., 2014). Tais atividades são fontes reconhecidas não só de pesticidas, mas PCBs e metais-traço.

Resultados dos níveis de resposta de biomarcadores suportam a ocorrência de metais-traço em botos do CEL. Níveis de transcrição de *MT2A* foram significativamente maiores em botos de CEL que botos do ELP. *MT2A* é a isoforma de metalotioneína mais comumente sintetizada em células de mamíferos e, assim como as demais isoformas, desempenha papel central no transporte e detoxificação de metais-traço, essenciais ou não essenciais, ligando-se covalentemente aos mesmos e impedindo que os mesmos reajam com outras moléculas celulares (KAYAALTI; MERGEN; SÖYLEMEZOĞLU, 2010; NORDBERG, 1998). Níveis maiores de transcrição de *MT2A* em botos do CEL indicam que estes animais estão expostos a uma maior contaminação por metais-traço, especialmente aqueles que formam íons divalentes, como cádmio, mercúrio, chumbo, bário, que botos do ELP, possivelmente em decorrência do aporte de resíduos de atividades de mineração desenvolvidas ao longo da bacia do Rio Tubarão que são carregados pelo rio até sua foz, na Lagoa de Santo Antônio. De fato, estudos prévios encontraram concentrações significativas de alumínio, magnésio, manganês, bário, cobre e chumbo ao longo do rio (LIMA et al., 2001; RODRIGUEZ-IRURETAGOIANA et al., 2015), reforçando a hipótese de que este seria uma relevante fonte de metais-traço para as lagoas de Santo Antônio dos anjos-Imaruí-Mirim.

Apesar da influência do local de origem sobre o perfil de contaminação e níveis de transcrição de *MT2A*, outras variáveis ecológicas, especialmente o sexo do indivíduo e a estação do ano em que foram coletadas as amostras exercem influência significativa tanto sobre os valores de contaminantes bioacumulados quanto sobre os níveis de resposta de diversos biomarcadores.

Resultados obtidos através dos GLMs apontam que para PCBs, DDTs e Mirex, sexo é uma variável ecológica que influencia significativamente os níveis de POPs bioacumulados. Para todos estes, machos apresentam concentrações significativamente mais elevadas que fêmeas. A correlação positiva obtida entre as classes de POPs e o nível

‘macho’ da variável sexo na FAMD suportam os achados dos GLMs. Tais resultados corroboram dados da literatura que descrevem menores níveis de contaminação em fêmeas reprodutivas, em decorrência da gravidez e, principalmente da amamentação, que possibilita mobilização e transferência de contaminantes lipofílicos acumulados no tecido adiposo de fêmeas aos filhotes (BORRELL et al., 1995).

Machos apresentaram níveis de transcrição de *MHCII* significativamente mais elevados que fêmeas. *MHCII* está envolvido diretamente na apresentação a linfócitos T de peptídeos exógenos digeridos (GERMAIN et al., 1996). Conjuntamente, tais resultados reforçam a hipótese de que animais mais contaminados estão expostos à maior incidência de patologias bacterianas e/ou fúngicas. Trabalhos prévios, no entanto, identificaram valores absolutos de moléculas *MHCII* menores em cetáceos acometidos por doenças fúngicas oportunistas (Lobomycosis Like Disease - *LLD*) (REIF et al., 2009), que representaria uma reduzida capacidade de reconhecimento e desencadeamento de resposta imune a fungos e bactérias. Trabalhos prévios também observaram uma redução nas taxas de atividade de linfócitos em resposta ao antígeno concavalina A (Con A) em animais contaminados por PCBs (LAHVIS et al., 1995). Conjuntamente, estes resultados prévios suportariam uma relação entre a bioacumulação de contaminantes ambientais e o desenvolvimento de um quadro de depleção imunológica que favorece a instalação destes organismos. Os resultados obtidos pelo presente trabalho, no entanto, não corroboram esta hipótese. Possivelmente, os níveis de POPs obtidos, em geral moderados, podem não ser suficientemente altos para levar a um quadro de imunodepleção.

Assim como o observado para *MHCII*, níveis de transcrição de *B-ACT* foram significativamente mais elevados em machos que em fêmeas. Verma e Shapiro (2006), similarmente, observaram transcrição diferencial de  $\beta$ -actina e outros genes de proteínas estruturais, como tubulina, em decorrência do sexo, ambos com níveis mais elevados de transcrição em machos, embora a razão para tal variação ainda não seja clara.

Além da influência do sexo, a estação do ano em que foram coletadas as amostras influenciou significativamente os valores de contaminantes bioacumulados mensurados e os níveis de resposta de diversos biomarcadores.

GLMs indicaram que para PCBs, DDTs e HCB, botos amostrados no inverno apresentam níveis de contaminantes

bioacumulados significativamente menores que botos amostrados no verão, um resultado também suportado pela correlação negativa obtida entre as classes de POPs e o nível 'inverno' da variável 'estação de coleta' na FAMD. Trabalhos prévios reportaram alterações sazonais na espessura da camada de gordura de *T. truncatus*, cujos indivíduos amostrados no inverno apresentam uma camada mais espessa por conta de um incremento na deposição de ácidos graxos, a fim de garantir o isolamento térmico nos períodos mais frios (MEAGHER et al., 2008). Este aumento na camada adiposa pode levar a um efeito de diluição dos contaminantes associados a este tecido, explicando os níveis mais altos de POPs mensurados em amostras coletadas no verão. Da mesma forma, um incremento metabólico durante o inverno, como descrito por Meagher et al. (2008), pode estar associado ao incremento de funções de excreção de POPs bioacumulados neste período. Adicionalmente, Samuel e Worthy (2004) ressaltam que há uma distinção entre o perfil de ácidos graxos de amostras de cetáceos coletadas no verão e no inverno, com as primeiras apresentando menores níveis de ácidos graxos poliinsaturados e concentrações maiores de monoinsaturados. Correlações negativas entre concentrações de organoclorados e ácidos graxos poliinsaturados obtidas por Guitart et al. (1996) indicam que pode haver, de fato, uma relação entre a estação do ano e os níveis de OCs bioacumulados em decorrência da variação no perfil de ácidos graxos, embora até o momento não estejam claras as razões para tal associação.

O incremento metabólico reportado para *T. truncatus* durante este inverno (MEAGHER et al., 2008) também pode ser responsável pelos níveis de transcrição de quase todos os genes avaliados, à exceção de *MHCII* e *ARNT*, significativamente maiores em botos amostrados no inverno quando comparados com aqueles amostrados no verão. O mesmo padrão foi observado através dos resultados da PCA.

Além dos níveis de transcrição gênica, variação sazonal também foi observada para a atividade GST, que se comporta de maneira similar à sazonalidade observada para a bioacumulação de POPs, apresentando valores menores em botos amostrados no inverno. Este padrão reforça a relação de GST com estes contaminantes, e pode estar relacionado ao incremento na deposição de lipídeos durante o inverno (MEAGHER et al., 2008), que dilui a carga de contaminantes e, por conseguinte, reduz a atividade de enzimas envolvidas na detoxificação, como a GST (EATON; BAMMLER, 1999).

Neste estudo, as variações sazonais dos níveis de transcrição de GST-pi e da atividade GST são opostas. Esta aparente desconexão pode estar relacionada ao fato de que a atividade analisada representa atividade de GST total, não direcionada a nenhuma de suas isoformas, enquanto os níveis transcrição reportam valores de amplificação de GST-pi. De fato, Van Dolah (2015) reportaram padrões distintos de variação sazonal para diferentes isoformas de GST, de maneira que os níveis de atividade mensurados no presente trabalho podem ser reflexo da atividade de outras isoformas de GST, não avaliadas pela qPCR.

As isoformas da enzima GST, especialmente as da família pi, sigma, rho e mi, são consideradas importantes biomarcadores de efeito a contaminantes orgânicos (BOUTET; TANGUY; MORAGA, 2004; HOARAU et al., 2001; PÉREZ-LÓPEZ; NÓVOA-VALIÑAS; MELGAR-RIOL, 2002; WAN; WHANG; LEE, 2008; ZHANG et al., 2012), uma vez que atuam diretamente na fase II de biotransformação de xenobióticos. Devido à função que desempenham, as GSTs tenderiam a apresentar valores maiores de atividade, expressão e/ou transcrição em decorrência de exposição a contaminantes.

No presente trabalho, apenas correlações moderadas não significativas foram observadas entre a atividade GST e transcrição de *GST-pi* e concentrações de POPs. No entanto, resultados da PCA indicam que atividade GST correlaciona-se positivamente às classes principais classes de POPs, suportando seu importante papel na biotransformação de contaminantes.

Apesar de aparentemente correlacionarem-se aos níveis de POPs mensurados, especialmente PBDEs e Mirex, valores absolutos de atividade GST foram baixos, se comparados a dados obtidos para outros grupos animais expostos a contaminantes orgânicos (LÜCHMANN et al., 2011). Este resultado pode ser decorrente dos níveis moderados de POPs mensurados nos animais. Paralelamente, Nash e colaboradores (2013) também reportaram níveis baixos de atividade GST em tecido epidérmico de misticetos. Desta forma, este resultado também pode indicar que, em cetáceos, a pele exerce um papel secundário na metabolização de contaminantes orgânicos. Esta última hipótese é reforçada pela ausência de atividade EROD no presente trabalho, além dos baixos níveis de transcritos de *CYP1A* no presente estudo e no trabalho de Noël (2014) realizado com belugas. Conjuntamente, estes dados indicam ausência de atividade de citocromos P450 da subfamília 1A em tecido tegumentar de odontocetos.



Além de evidenciar correlação de atividade GST e classes de contaminantes orgânicos acumulados, resultados da PCA também indicam a existência de correlação entre atividade SOD e GPx e especialmente PBDEs e Mirex, assim como entre atividade GR e DDTs, especialmente.

GR é responsável pela reciclagem da forma dissulfídica de glutatona (GSSG) a sua forma reduzida (GSH), utilizada como cofator de GST para a biotransformação de xenobióticos (REGOLI; BENEDETTI; GIULIANI, 2011). Assim, a correlação positiva observada entre atividade GR e níveis de POPs bioacumulados pode indicar que em botos mais contaminados há uma maior necessidade de GSH, a fim de possibilitar o incremento das taxas de biotransformação.

Resultados obtidos para SOD suportam que a exposição dos botos amostrados aos contaminantes mensurados aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, em especial de radicais superóxido ( $O_2^-$ ), estimulando maior atividade SOD em animais mais contaminados.

Um incremento na atividade SOD aumentaria a produção de peróxidos, que são metabolizados por enzimas como CAT ou GPx. GPx tem sido apontada como a enzima prioritária para detoxificação de peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) quando os mesmos são produzidos em taxas baixas, sendo catalase (CAT) a enzima preponderante quando as taxas de formação de  $H_2O_2$  elevam-se (HO et al., 2004).

No entanto não foi observada atividade CAT nos indivíduos avaliados. Da mesma forma, apenas uma correlação fraca correlação entre GPx e os níveis de POPs bioacumulados pode ser observada através da PCA. Tais resultados podem sugerir conjuntamente que há baixa produção  $H_2O_2$  no tecido tegumentar dos botos amostrados, não havendo incremento significativo de  $H_2O_2$  em decorrência da exposição aos níveis de POPs mensurados. É possível também que haja um incremento na produção de  $H_2O_2$ , porém em níveis baixos, que não requereriam aumento na atividade CAT e GPx, uma vez que  $H_2O_2$  é menos reativo que outras EROS, podendo inclusive ser utilizado como substrato em outras vias metabólicas (GIORGIO et al., 2007).

Além da correlação com a atividade enzimática, resultados da PCA também permitem observar correlação positiva entre os níveis de transcritos de *ARNT* e as principais classes de contaminantes orgânicos, especialmente DDTs. *ARNT* é a proteína responsável por translocar AHR ativado para o núcleo em resposta a PCBs, HPAs e outros compostos similares à dioxina. Uma vez no núcleo, o complexo AHR/*ARNT* ativa regiões do genoma denominadas elementos

responsivos a xenobióticos, que induzem a transcrição de genes do sistema de biotransformação (HANKINSON, 1995; LAPSERITIS, 2007; ZHOU et al., 2010). Devido a este papel, *ARNT*, assim como *AHR* são potenciais biomarcadores de exposição a contaminantes orgânicos (BUCKMAN et al., 2011; NOËL et al., 2014). Ao contrário do observado para *ARNT*, no entanto, *AHR* não aparenta correlacionar-se com organoclorados bioacumulados nos botos. Esta dissimilaridade pode ser atribuída aos níveis moderados de POPs identificados (BROWN et al., 2014; BUCKMAN et al., 2011) ou à significativa variação da transcrição de *AHR* em decorrência da estação do ano, não observada para *ARNT*.

Ao contrário da influência significativa observada para sexo e estação do ano, a variável faixa etária não influenciou significativamente os níveis de resposta de biomarcadores, e não contribuiu significativamente para a construção dos GLMs para nenhuma das classes de contaminantes. No entanto, foi observada uma correlação positiva entre o nível ‘adulto’ e as classes de POPs na FAMD, indicando que animais mais novos apresentam menores níveis de POPs bioacumulados. Este resultado está associado à característica gradual do processo de bioacumulação destes compostos que ocorre ao longo da vida dos indivíduos (YORDY et al., 2010). A estabilidade e persistência dos POPs, além da reduzida capacidade de detoxificação de cetáceos, também contribuem para que animais mais velhos apresentem níveis mais elevados destes contaminantes (TANABE et al., 1988). A ausência de significância da variável ‘faixa etária’ nos GLMs, no entanto, pode ser devido à existência de fêmeas reprodutivas entre adultos, contribuindo para a suavização dos valores de POPs deste grupo. Vale ressaltar também que, para machos, há um aumento progressivo nos valores de POPs bioacumulados ao longo da vida, sendo este padrão mais dificilmente identificado caso a amostragem de adultos possua muitos indivíduos adultos ‘novos’(YORDY et al., 2010).

De maneira geral, o presente trabalho encontrou níveis moderados de POPs nos botos amostrados. Embora botos de CEL e ELP tenham mostrado distinções quanto à prevalência de algumas classes de POPs, foi observada pouca distinção entre os valores de resposta de biomarcadores para botos das distintas localidades. A ausência de distinção quanto aos valores de resposta de biomarcadores pode ser devida aos níveis moderados de contaminação.

A significativa influência de outras variáveis como sexo e estação de coleta sobre níveis de contaminação e valores de resposta de

biomarcadores também dificultou a distinção entre locais, bem como a identificação de correlação direta entre POPs e a resposta de biomarcadores avaliados.

Não obstante, considerada a influência de variáveis ecológicas, os resultados do presente trabalho suportam a utilização de diversos biomarcadores de exposição e de efeito a contaminantes orgânicos em tegumento de *T. truncatus*. Desta forma, amplia-se o espectro de ferramentas disponíveis para o monitoramento da saúde individual e populacional de cetáceos de vida livre.



## 5 CONCLUSÕES

- Botos apresentaram níveis moderados de POPs bioacumulados;
- Botos de CEL apresentaram concentrações mais elevadas de DDTs, enquanto botos de ELP apresentaram concentrações mais elevadas de PCBs e Mirex;
- A ausência de correlações altas entre os valores de resposta de biomarcadores bioquímicos e moleculares e os níveis de POPs bioacumulados pode estar relacionada a estes níveis moderados;
- Houve uma ampla variação sazonal dos níveis de transcrição da maioria dos genes analisados, que evidenciam um viés metabólico sobre a transcrição gênica que deve ser levada em consideração para a utilização desta ferramenta como biomarcador de exposição a contaminantes orgânicos;
- Padrões de resposta de biomarcadores moleculares e a concentração de POPs podem ter sido mascaradas pela varibilidade sazonal observada;
- Dentre as classes de contaminantes, as concentrações de PBDEs mensuradas no presente trabalho foram altas o suficiente para elicitarem resposta bioquímica e molecular, tendo em vista que os maiores valores de correlação obtidos para biomarcadores bioquímicos e moleculares foram obtidos em relação à concentração de PBDEs;
- Apesar dos níveis moderados de POPs, os resultados obtidos reforçam o potencial da atividade de GST como biomarcador de exposição a POPs, bem como sugere a expressão de *ARNT* e a atividade de GR como potenciais biomarcadores;
- Os valores de expressão gênica de *ILI* e *MHCII* não suportam a hipótese de que a população de Laguna estaria sujeita a um quadro de depleção imunológica associada à contaminação orgânica que facilitaria o acometimento de seus indivíduos por LLD, sendo possível que a ocorrência desta patologia esteja associada a fatores físico-químico dos ambientes ou a fatores genéticos que tornem algumas populações susceptíveis ao desenvolvimento da doença;
- Por fim, os padrões de POPs nos indivíduos de CEL reforçam a necessidade de um manejo adequado das atividades desenvolvidas ao longo do Rio Tubarão e seus tributários, a fim de reduzir o aporte de contaminantes ao CEL, para a boca do rio e ao canal que liga o complexo ao mar, áreas intensamente utilizadas pelos botos e para a própria pesca artesanal, que depende econômica e socialmente da qualidade ambiental do complexo.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, J. et al. The relationship between land use and emerging and legacy contaminants in an Apex predator, the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), from two adjacent estuarine watersheds. **Environmental Research**, v. 135, p. 346–353, 2014.

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.

AGUILAR, A. Using organochlorine pollutants to discriminate marine mammal populations: a review and critique of the methods. **Marine Mammal Science**, v. 3, n. 3, p. 242–262, 1987.

AHLING, B.; LINDSKOG, A. Thermal destruction of PCB and hexachlorobenzene. **Science of the Total Environment**, The, v. 10, n. 1, p. 51–59, 1978.

ALLOWAY, B. J. Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils. In: **Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability**. [s.l: s.n.]. v. 2p. 16–19.

ALONSO, M. B. Organoclorados em Toninhas , *Pontoporia blainvillei* ( MAMMALIA : CETACEA ) da região costeira do Estado de São Paulo , Brasil. 2008.

ALONSO, M. B. et al. Anthropogenic (PBDE) and naturally-produced (MeO-PBDE) brominated compounds in cetaceans - A review. **Science of the Total Environment**, v. 481, n. 1, p. 619–634, 2014.

ANGELL, C. M. et al. Cytochrome P450 1A1 expression in cetacean integument: Implications for detecting contaminant exposure and effects. **Marine Mammal Science**, v. 20, n. 3, p. 554–566, 2004.

ARENAS-HUERTERO, F. et al. Molecular Markers Associated with the Biological Response to Aromatic Hydrocarbons from Urban Air in Humans. In: **Air Pollution - new developments**. [s.l: s.n.]. p. 87–112.

BACHMAN, M. J. et al. Using cytochrome P4501A1 expression in liver and blubber to understand effects of persistent organic pollutant exposure in stranded Pacific Island cetaceans. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 9, p. 1989–1995, 2015.

BAINY, A. C. D. Nuclear receptors and susceptibility to chemical exposure in aquatic organisms. **Environment International**, v. 33, n. 4, p. 571–575, 2007.

BANERJEE, B. D. et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. **Toxicology Letters**, v. 107, n. 1–3, p. 33–47, 1999.

BÄR, E. et al. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK Cells. **Immunity**, v. 40, n. 1,

p. 117–127, 2014.

BARÓN, E. et al. Bioaccumulation and biomagnification of classical flame retardants, related halogenated natural compounds and alternative flame retardants in three delphinids from Southern European waters. **Environmental Pollution**, v. 203, p. 107–115, 2015.

BECK, J.; HANSEN, K. E. The degradation of quintozone, pentachlorobenzene, hexachlorobenzene and pentachloroaniline in soil. **Pesticide Science**, v. 5, n. 1, p. 41–48, 1974.

BENARD, G. et al. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, n. 4, p. 248–252, 2001.

BENGTON NASH, S. et al. Detoxification enzyme activities (CYP1A1 and GST) in the skin of humpback whales as a function of organochlorine burdens and migration status. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 207–212, 2014.

BENGTON NASH, S. M.; WAUGH, C. A.; SCHLABACH, M. Metabolic concentration of lipid soluble organochlorine burdens in the blubber of southern hemisphere humpback whales through migration and fasting. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 16, p. 9404–9413, 2013.

BERROW, S. D. et al. Organochlorine concentrations in resident bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Shannon estuary, Ireland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 11, p. 1296–1303, 2002.

BONEFELD-JØRGENSEN, E. C. et al. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. **Toxicology**, v. 158, n. 3, p. 141–153, 2001.

BOON, J. P. et al. Concentration-dependent changes of PCB patterns in fish-eating mammals: Structural evidence for induction of cytochrome P450. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 298–311, 1997.

BORRELL, A. et al. AGE TRENDS AND REPRODUCTIVE TRANSFER OF ORGANOCHLORINE COMPOUNDS IN LONG-FINNED PILOT WHALES FROM THE FAROE ISLANDS. **Environmental Pollution**, v. 88, p. 283–292, 1995.

BORRELL, A. et al. Organochlorine compounds and stable isotopes indicate bottlenose dolphin subpopulation structure around the Iberian Peninsula. **Environment International**, v. 32, p. 516–523, 2006.

BOSSART, G. D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 3, p. 676–690, 2011.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. **Marine Biology**, v. 146, n. 1, p.



53–64, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

Brasil 2009. **Lei nº 11.936, de 14 de maio de 2009**. Presidência da República. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2009/Lei/L11936.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/Lei/L11936.htm), acesso em agosto de 2016.

BREIVIK, K. et al. Primary sources of selected POPs: Regional and global scale emission inventories. **Environmental Pollution**, v. 128, n. 1–2, p. 3–16, 2004.

BROUWER, A.; REIJNDERS, P. J. H.; KOEMAN, J. H. Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated fish induces vitamin A and thyroid hormone deficiency in the common seal (*Phoca vitulina*). **Aquatic Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 99–105, 1989.

BROWN, T. M. et al. PCB related effects thresholds as derived through gene transcript profiles in locally contaminated ringed seals (*Pusa hispida*). **Environmental Science & Policy**, 2014.

BUCKMAN, A. H. et al. PCB-associated changes in mRNA expression in killer whales (*Orcinus orca*) from the NE pacific ocean. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 23, p. 10194–10202, 2011.

BUHLER, D. R.; WILLIAMS, D. E. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. **Aquatic Toxicology**, v. 11, n. 1–2, p. 19–28, 1988.

CANTÚ-MEPELLÍN, N. et al. Differential antioxidant protection in tissues from marine mammals with distinct diving capacities. Shallow/short vs. deep/long divers. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 158, n. 4, p. 438–443, 2011.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in enzymology**, v. 113, n. 1955, p. 484–490, 1985.

CARPENÈ, E.; ANDREANI, G.; ISANI, G. Metallothionein functions and structural characteristics. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, n. SUPPL. 1, p. 35–39, 2007.

CELANDER, M. C.; MOORE, M. J.; STEGEMAN, J. J. Cellular localization of CYP3A proteins in various tissues from pilot whale (*Globicephala melas*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 245–253, 2000.

CLARK, J. R. Coastal Natural Resources System. In: **Integrated management of coastal zones**. Rome: FAO, 1992. p. 167.

COGLIANO, V. J. Assessing the cancer risk from environmental PCBs. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 6, p. 317–323, 1998.

COSTA, A. P. B. et al. Offshore and coastal common bottlenose

dolphins of the western South Atlantic face-to-face : What the skull and the spine can tell us. **Marine Mammal Science**, p. 1–25, 2016.

DAS, K.; DEBACKER, V.; BOUQUEGNEAU, J. M. **Metallothioneins in marine mammals. Cellular and Molecular Biology**, 2000.

DAURA-JORGE, F. G. Quantos? Onde? Como? Múltiplos aspectos ecológicos de uma população do boto-da-tainha (*Tursiops truncatus*) em Laguna , sul do Brasil : implicações para conservação. p. 264, 2011.

DAURA-JORGE, F. G. et al. The structure of a bottlenose dolphin society is coupled to a unique foraging cooperation with artisanal fishermen. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 702–705, 2012.

DAURA-JORGE, F. G.; INGRAM, S. N.; SIMÕES-LOPES, P. C. Seasonal abundance and adult survival of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in a community that cooperatively forages with fishermen in southern Brazil. **Marine Mammal Science**, v. 29, n. 2, p. 293–311, 2013.

DAURA-JORGE, F. G.; SIMOES-LOPES, P. C. Lobomycosis-like disease in wild bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* of Laguna, southern Brazil: monitoring a progressive case. **Diseases of aquatic organisms**, v. 93, p. 163–170, 2011.

DE SWART, R. L. et al. Impaired immunity in harbour seals (*Phoca vitulina*) exposed to bioaccumulated environmental contaminants: Review of a long-term feeding study. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. SUPPL. 4, p. 823–828, 1996.

DE WIT, C. A. An overview of brominated flame retardants in the environment. **Chemosphere**, v. 46, n. 5, p. 583–624, 2002.

DEL ROSSO, C. B. **Avaliação dos aportes de hidrocarbonetos à Lagoa dos Patos (RS- Brasil)**. [s.l.] Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

DESFORGES, J.-P. W. et al. Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. **Environment International**, v. 86, p. 126–139, 2016.

DINARELLO, A.; ENGLAND, N. Biology of Interleukin-1. **FASEB**, 1988.

DORNELES, P. R. et al. High accumulation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in marine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis*) from the Brazilian coast. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 14, p. 5368–5373, 2008a.

DORNELES, P. R. et al. Evaluation of cetacean exposure to organotin compounds in Brazilian waters through hepatic total tin concentrations. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 1268–1276, 2008b.

DURANTE, C. A. et al. POPs in the South Latin America: Bioaccumulation of DDT, PCB, HCB, HCH and Mirex in blubber of

common dolphin (*Delphinus delphis*) and Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei*) from Argentina. **Science of The Total Environment**, v. 572, p. 352–360, 2016.

EATON, D. L.; BAMMLER, T. K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 49, n. 2, p. 156–164, 1999.

ELLISOR, D. et al. The distribution and stratification of persistent organic pollutants and fatty acids in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) blubber. **Science of the Total Environment**, v. 463–464, p. 581–588, 2013.

ESPERÓN, F. et al. Molecular diagnosis of lobomycosis-like disease in a bottlenose dolphin in captivity. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 50, n. January, p. 106–109, 2012.

FAIR, P. A. et al. Contaminant blubber burdens in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from two southeastern US estuarine areas: Concentrations and patterns of PCBs, pesticides, PBDEs, PFCs, and PAHs. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 7, p. 1577–1597, 2010.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 105, n. July, p. 114–120, 1984.

FOSSI, M. C. et al. The Use of Non-destructive Biomarker in Mediterranean Cetaceans: Preliminary Data on MFO Activity in Skin Biopsy. **Marine Pollution Bulletin**, v. 24, n. 9, p. 459–461, 1992.

FOSSI, M. C. et al. Assessment of toxicological status of a SW Mediterranean segment population of striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) using skin biopsy. **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2–5, p. 269–274, 2004.

FOSSI, M. C. et al. First detection of CYP1A1 and CYP2B induction in Mediterranean cetacean skin biopsies and cultured fibroblasts by Western blot analysis. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 3–6, 2008.

FOSSI, M. C. et al. The Pelagos Sanctuary for Mediterranean marine mammals: Marine Protected Area (MPA) or marine polluted area? The case study of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 70, n. 1–2, p. 64–72, 2013.

FOSSI, M. C. et al. Could feeding habit and migratory behaviour be the causes of different toxicological hazard to cetaceans of Gulf of California (Mexico)? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 23, p. 13353–13366, 2014.

FOSSI, M. C. et al. Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. **Environmental Pollution**, v. 209, p. 68–78, 2016.

FOSSI, M. C.; MARSILI, L. Effects of endocrine disruptors in

aquatic mammals. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 11–12, p. 2235–2247, 2003.

FRUET, P. F. et al. Abundance of bottlenose dolphins , *Tursiops truncatus* ( Cetacea : Delphinidae ), inhabiting the Patos Lagoon estuary , southern Brazil : Implications for conservation. **Zoologia**, v. 28, n. 1, p. 23–30, 2011.

FRUET, P. F. et al. Abundance and demography of bottlenose dolphins inhabiting a subtropical estuary in the Southwestern Atlantic Ocean. **Journal of Mammalogy**, v. 96, n. 2, p. 332–343, 2015.

GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function , production and clinical applications. **Cytokine**, v. 28, p. 109–123, 2004.

GARCÍA-ALVAREZ, N. et al. Levels and profiles of POPs (organochlorine pesticides, PCBs, and PAHs) in free-ranging common bottlenose dolphins of the Canary Islands, Spain. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 22–31, 2014.

GARCIA, J. G. **Acumulação de Elementos traço em organismos no estuário da Lagoa dos Patos**. [s.l.] Universidade Federal de Rio Grande, 2011.

GARCIA, M. REBACK DOMINGUES. **Contribuição de efluentes urbano-industriais na contaminação por HPAs dos sedimentos estuarinos da Lagoa dos Patos (Rio Grande,RS)**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande, 2004.

GARRICK, R. A. et al. Cytochrome P4501A is induced in endothelial cell lines from the kidney and lung of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 3–4, p. 295–305, 2006.

GERMAIN, R. N. et al. Processing and Presentation of Endocytically Acquired Protein Antigens by MHC Class II and Class I Molecules. **Immunological Reviews**, v. 151, n. 1, p. 5–30, 1996.

GIORGIO, M. et al. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 722–728, 2007.

GIULIANI, M. E. et al. Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. **Aquatic Toxicology**, v. 134–135, p. 120–127, 2013.

GOKSOYR, A. et al. Xenobiotic and Steroid Metabolism in Adult and Foetal Piked ( Minke ) Whales , *Balaenoptera acutorostrata*. **Marine Environmental Research**, v. 24, p. 9–13, 1988.

GOKSOYR, A. Cytochrome P450 in marine mammals : isozyme forms , catalytic functions , and physiological regulations. In: **Whales, Seals, Fish and man**. [s.l: s.n.]. p. 629–639.

GUITART, R. et al. Organochlorine Residues in Tissues of Striped Dolphins Affected by the 1990 Mediterranean Epizootic : Relationships

with the Fatty Acid Composition. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, p. 79–83, 1996.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 22, p. 7130–7140, 1974.

HALL, A. J. et al. Individual-based model framework to assess population consequences of polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. SUPPL.1, p. 60–64, 2006.

HALLGREN, S. et al. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. **Archives of Toxicology**, v. 75, n. 4, p. 200–208, 2001.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr**, v. 16, p. 33–50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J**, v. 219, p. 1–14, 1984.

HANKINSON, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. **Annual review Pharmacology and toxicology**, v. 35, p. 307–340, 1995.

HANSEN, L. J. et al. Geographic variation in polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide concentrations in the blubber of bottlenose dolphins from the US Atlantic coast. **The Science of the total environment**, v. 319, p. 147–172, 2004.

HASSALL, K. A.; MANNING, D. Anaerobic Metabolism of DDT Analogs by Pigeon Liver Preparations. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 2, p. 331–336, 1972.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 6, p. 445–600, 1995.

HO, Y. S. et al. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32804–32812, 2004.

HOARAU, P. et al. Differential induction of Glutathione S-Transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 523–529, 2001.

HOOKE, S. K. et al. Changes in persistent contaminant concentration and CYP1A1 protein expression in biopsy samples from northern bottlenose whales, *Hyperoodon ampullatus*, following the onset of nearby oil and gas development. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 1, p. 205–216, 2008.

HUSSON, F. et al. **Package “ FactoMineR ”**, 2008. Disponível em: <http://www.jstatsoft.org/v25/i01/>

ISOBE, T. et al. Organohalogen contaminants in striped dolphins ( *Stenella coeruleoalba* ) from Japan : Present contamination status , body distribution and temporal trends ( 1978 – 2003 ). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 396–401, 2009.

JAKIMSKA, A. et al. Bioaccumulation of metals in tissues of marine animals, part I: The role and impact of heavy metals on organisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 5, p. 1117–1125, 2011.

JEPSON, P. D. et al. RELATIONSHIPS BETWEEN POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND HEALTH STATUS IN HARBOR PORPOISES ( *PHOCOENA PHOCOENA* ) STRANDED IN THE UNITED KINGDOM. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 238–248, 2005.

JONES, K. C.; DE VOOGT, P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. **Environmental Pollution**, v. 100, n. 1–3, p. 209–221, 1999.

KAJIWARA, N. et al. Contamination by Persistent Organochlorines in Cetaceans Incidentally Caught Along Brazilian Coastal Waters. **Archives in Environmental contamination and toxicology**, v. 134, n. September 2000, p. 124–134, 2004.

KANERVA, M. et al. Antioxidative defense and oxidative stress in ringed seals ( *Pusa hispida* ) from differently polluted areas. **Aquatic Toxicology**, v. 114–115, p. 67–72, 2012.

KARUPPIAH, S.; SUBRAMANIAN, A.; OBBARD, J. P. Organochlorine residues in odontocete species from the southeast coast of India. **Chemosphere**, v. 60, n. 7, p. 891–897, 2005.

KASPRZAK, K. S. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis<sup>1,3</sup> <sup>1</sup>This article is part of a series of reviews on “Oxidative DNA Damage and Repair.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. <sup>3</sup>Guest Editor: Miral D. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 10, p. 958–967, 2002.

KAYAAALTI, Z.; MERGEN, G.; SÖYLEMEZOĞLU, T. Effect of metallothionein core promoter region polymorphism on cadmium, zinc and copper levels in autopsy kidney tissues from a Turkish population. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 245, n. 2, p. 252–255, 2010.

KELLY, B. C. Food Web – Specific Biomagnification of Persistent Organic Pollutants. **Science**, v. 317, n. 236, p. 236–239, 2007.

KENNEDY, S. W.; JONES, S. P. Simultaneous measurement of CYP4501A catalytic activity and total protein.pdf. **Analytical biochemistry**, v. 222, p. 217–223, 1994.

KITAMURA, S. et al. REDUCTIVE METABOLISM OF p , p - DDT AND o , p -DDT BY RAT LIVER CYTOCHROME P450

ABSTRACT : **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 2, p. 113–118, 2002.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, M. Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. **Antioxidants and redox signalling**, v. 7, n. 3 & 4, p. 385–394, 2005.

KRAHN, M. M. et al. Stratification of lipids , fatty acids and organochlorine contaminants in blubber of white whales and killer whales. **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 6, n. 2, p. 175–189, 2004.

LAHVIS, G. P. et al. Decreased Lymphocyte Responses in Free-ranging Bottlenose Dolphins ( *Tursiops truncatus* ) Are Associated with Increased Concentrations of PCBs and DDT in Peripheral Blood. **Environmental Health Perspectives**, n. 410, 1995.

LAILSON-BRITO, J. et al. Dolphins as indicators of micropollutant flow in amazon basin. **Oecologia Bras.**, v. 12, n. 3, p. 531–541, 2008.

LAILSON-BRITO, J. et al. High organochlorine accumulation in blubber of Guiana dolphin, *Sotalia guianensis*, from Brazilian coast and its use to establish geographical differences among populations. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1800–1808, 2010.

LAILSON-BRITO, J. et al. Organochlorine concentrations in franciscana dolphins , *Pontoporia blainvillei* , from Brazilian waters. **Chemosphere**, v. 84, p. 882–887, 2011.

LAILSON-BRITO, J. et al. Organochlorine compound accumulation in delphinids from Rio de Janeiro State, southeastern Brazilian coast. **Science of the Total Environment**, v. 433, p. 123–131, 2012.

LAPSERITIS, J. M. **Comparative Analyses of Aryl Hydrocarbon Receptor Structure, Function and Evolution in Marine Mammals**. [s.l.] Massachusetts Institute of Technology, 2007.

LEBLANC, G. A.; BAIN, L. J. Chronic toxicity of environmental contaminants: Sentinels and biomarkers. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. SUPPL. 1, p. 65–80, 1997.

LEIJS, M. M. et al. Effects of dioxins, PCBs, and PBDEs on immunology and hematology in adolescents. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 20, p. 7946–7951, 2009.

LEMAIRE, G. et al. Activation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. **Life Sciences**, v. 79, n. 12, p. 1160–1169, 2006.

LEONEL, J. et al. Contamination by chlorinated pesticides , PCBs and PBDEs in Atlantic spotted dolphin ( *Stenella frontalis* ) in western South Atlantic. **Chemosphere**, v. 86, n. 7, p. 741–746, 2012.

LIMA, M. C. et al. Especificação De Cobre E Chumbo Em Sedimento Do Rio Tubarão (Sc) Pelo Método Tessier. **Q. Nova**, v. 24, n. 6, p. 734–742, 2001.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 137–147, 2009.

LIU, S.; LI, S.; DU, Y. Polychlorinated biphenyls (PCBs) enhance metastatic properties of breast cancer cells by activating rho-associated kinase (ROCK). **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.

LOPES, F. R. A. S. **Análise temporal da resposta de biomarcadores bioquímicos e do nível de metais traço na ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*, (GUILDING, 1828) cultivadas no complexo estuarino de Laguna, SC.** [s.l.: s.n.].

LOPEZ, E. L. et al. **Tópicos Especiais em Proteção de Plantas.** [s.l.: s.n.].

LÓPEZ, O. et al. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. **Toxicology Letters**, v. 171, n. 3, p. 146–153, 2007.

LUCHMANN, K. H. et al. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 166, p. 10–20, 2015.

LÜCHMANN, K. H. et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 652–660, 2011.

MAHFOUZ, C. et al. Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded along the southern North Sea: An assessment through metallic contamination. **Environmental Research**, v. 133, p. 266–273, 2014.

MANCIA, A. et al. Machine learning approaches to investigate the impact of PCBs on the transcriptome of the common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Marine Environmental Research**, v. 100, p. 57–67, 2014.

MANCIA, A. et al. Microarray applications to understand the impact of exposure to environmental contaminants in wild dolphins (*Tursiops truncatus*). **Marine Genomics**, v. 19, p. 47–57, 2015.

MARSILI, L. et al. “Test Tube Cetaceans”: From the Evaluation of Susceptibility to the Study of Genotoxic Effects of Different Environmental Contaminants Using Cetacean Fibroblast Cell Cultures. 2012.

MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J.-A. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. **Nuclear receptor signaling**, v. 4, p. e016, 2006.

MCKINNEY, M. A. et al. Characterization and profiling of hepatic cytochromes P450 and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in beluga



whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence River Estuary and the Canadian Arctic. **Aquatic Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 35–49, 2004.

MCKINNEY, M. A. et al. Biotransformation of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and rat mammalian model using an in vitro hepatic microsomal assay. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 87–97, 2006.

MEAGHER, E. M. et al. Seasonal patterns of heat loss in wild bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 178, n. 4, p. 529–543, 2008.

MÉNDEZ-FERNANDEZ, P. et al. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. **Marine Pollution Bulletin**, v. 107, p. 364–369, 2016.

MILLER, K. A. Cytochrome P450 as a biomarker of contaminant exposure in free-ranging marine mammals. n. March, 2003.

MIRLEAN, N. et al. Arsenic pollution in Patos Lagoon estuarine sediments, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 1480–1484, 2003.

MIRLEAN, N.; ANDRUS, V. E.; BAISCH, P. Mercury pollution sources in sediments of Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 331–334, 2003.

MMA. **Áreas Prioritárias para a Conservação, Uso Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira: Atualização - Portaria MMA nº09, de 23 de janeiro de 2007.** [s.l.: s.n.].

MONSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 221–234, 2007.

MONTIE, E. W. et al. Cytochrome P4501A1 expression, polychlorinated biphenyls and hydroxylated metabolites, and adipocyte size of bottlenose dolphins from the Southeast United States. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 397–412, 2008.

MOORE, M. T. et al. Comparative toxicity of chlordane, chlorpyrifos, and aldicarb to four aquatic testing organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 152–157, 1998.

MORENO, I. B. et al. Mycotic Dermatitis in Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) from Southern Brazil, with a Confirmed Record of Lobomycosis Disease. **SC/60/DW1, Workshop on cetacean skin diseases of the International Whaling Commission.**, p. 1–11, 2008.

MULLER, S. et al. Evaluation of immune and stress status in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*): can hormones and mRNA expression levels serve as indicators to assess stress? **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 145, 2013.

MUÑOZ, H. R.; BORTOLUZZI, I. P. Desenvolvimento Regional e Gestão de Recursos Hídricos. O cenário na Bacia do rio Tubarão, SC. In: **Interfaces da Gestão dos Recursos Hídricos**. [s.l: s.n.]. p. 257–421.

MURPHY, S. et al. Assessing the effect of persistent organic pollutants on reproductive activity in common dolphins and harbour porpoises. **Journal of Northwest Atlantic Fishery Science**, v. 42, n. May, p. 153–173, 2010.

NCBI 2016a. **Compound Summary for CID 8370**. PubChem Open Chemistry Database. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hexachlorobenzene>, acesso em setembro de 2016.

NCBI 2016b. **Compound Summary for CID 16945**. PubChem Open Chemistry Database. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/mirex>, acesso em novembro de 2016.

NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. W. M. Generalized Linear Models. **Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)**, v. 13517213, n. 3, p. 370–384, 1972.

NOËL, M. et al. PCBs are associated with altered gene transcript profiles in arctic Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*). **Environmental science & technology**, v. 48, n. 5, p. 2942–51, 2014.

NORDBERG, M. Metallothioneins: Historical review and state of knowledge. **Talanta**, v. 46, n. 2, p. 243–254, 1998.

OGATA, M.; IZUSHI, F. Effects of chlordanes on parameters of liver and muscle toxicity in man and experimental animals. **Toxicology Letters**, v. 56, n. 3, p. 327–337, 1991.

OHTAKE, F. et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. **Nature**, v. 423, n. 6939, p. 545–550, 2003.

OMIECINSKI, C. J. et al. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. SUPPL.1, 2011.

OSÓRIO, F. H. T. et al. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9145–9160, 2014.

PANTI, C. et al. Ecotoxicological diagnosis of striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean basin by skin biopsy and gene expression approach. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 8, p. 1791–1800, 2011.

PARK, E. J.; PARK, K. Induction of oxidative stress in human Chang liver cells by octachlorostyrene, the persistent and bioaccumulative toxicant. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 2, p. 367–375, 2008.

PARKINSON, A.; KLAASEN, C. D.; WATKINS, J. B. Biotransformation of xenobiotics. **Casarett & Doull's Essentials of Toxicology**, p. 133–144, 2001.

PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 3, n. 3, p. 157–60, 1994.

PÉREZ-LÓPEZ, M.; NÓVOA-VALIÑAS, M. C.; MELGAR-RIOL, M. J. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. **Toxicology Letters**, v. 136, n. 2, p. 97–106, 2002.

PERRIN, W. F. et al. Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: Cranial differentiation of coastal and offshore ecotypes. **Marine Mammal Science**, v. 27, n. 4, p. 769–792, 2011.

PNUMA. **Os Nove Novos POPs: Uma introdução às nove substâncias químicas adicionadas à Convenção de Estocolmo na quarta reunião da Conferência das Partes**. 2010

RAKITSKY, V. N.; KOBLYAKOV, V. A.; TURUSOV, V. S. Nongenotoxic (epigenetic) carcinogens: Pesticides as an example. A critical review. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 229–240, 2000.

REGOLI, F. et al. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4 SUPPL., p. 56–66, 2011.

REGOLI, F.; BENEDETTI, M.; GIULIANI, M. E. Antioxidant Defenses and Acquisition of Tolerance to Chemical Stress. In: **Tolerance to Environmental Contaminants**. [s.l: s.n.]. p. 153–173.

REIF, J. S. et al. Immune dysfunction in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) with lobomycosis. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 47, n. 2, p. 125–135, 2009.

REPETTO, R.; BALIGA, S. S. **Pesticides and immunosuppression: The risks to public health** *Health Policy and Planning*, 1997.

RESGALLA, C. et al. Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas, Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 8, p. 565–571, 2007.

RIGHETTI, B. P. H. et al. Relating diving behavior and antioxidant status: Insights from oxidative stress biomarkers in the blood of two distinct divers, *Mirounga leonina* and *Arctocephalus australis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 173, p. 1–6, 2014.

RODRIGUEZ-IRURETAGOIANA, A. et al. Fate of hazardous

elements in agricultural soils surrounding a coal power plant complex from Santa Catarina (Brazil). **Science of The Total Environment**, v. 508, p. 374–382, 2015.

ROESIJADI, G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 113, n. 2, p. 117–123, 1996.

ROSEL, P. E. PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 647–649, 2003.

ROSS, K. et al. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: A comparison between populations from contaminated and reference sites. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 7, p. 671–679, 2002.

ROUTTI, H. et al. Biotransformation of PCBs in Relation to Phase I and II Xenobiotic-Metabolizing Enzyme Activities in Ringed Seals ( *Phoca hispida* ) from Svalbard and the Baltic Sea. **Environ. Sci. Technol.**, v. 42, n. 23, p. 8952–8958, 2008.

SAMUEL, A. M.; WORTHY, G. A. J. Variability in fatty acid composition of bottlenose dolphin ( *Tursiops truncatus* ) blubber as a function of body site , season , and reproductive state. **canadian Journal of Zoology**, v. 82, p. 1933–1942, 2004.

SANTOS-NETO, E. B. et al. Organochlorine concentrations (PCBs, DDTs, HCHs, HCB and MIREX) in delphinids stranded at the northeastern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 194–203, 2014.

SCHAEFER, A. M. et al. Associations between mercury and hepatic, renal, endocrine, and hematological parameters in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) along the eastern coast of Florida and South Carolina. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 61, n. 4, p. 688–95, 2011.

SCHLEZINGER, J. J. et al. Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 4, p. 422–432, 2006.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHRODER, K. et al. IFN Gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. February, 2004.

SCHWACKE, L. H. et al. Probabilistic risk assessment of reproductive effects of polychlorinated biphenyls on bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Southeast United States Coast. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 2752–2764, 2002.

SCHWACKE, L. H. et al. Anaemia, hypothyroidism and immune suppression associated with polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1726, p. 48–57, 2012.

SEAMAN, D. E.; POWELL, R. A. An Evaluation of the Accuracy of Kernel Density Estimators for Home Range Analysis AN EVALUATION OF THE ACCURACY OF KERNEL DENSITY ESTIMATORS FOR HOME RANGE ANALYSIS1. v. 77, n. 7, p. 2075–2085, 1996.

SEGURA, I. et al. Conservation implications of the genetic and ecological distinction of *Tursiops truncatus* ecotypes in the Gulf of California. **Biological Conservation**, v. 133, n. 3, p. 336–346, 2006.

SHAHID, A. et al. Methanolic bark extract of *Acacia catechu* ameliorates benzo(a)pyrene induced lung toxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 5, p. 1566–1577, 2017.

SIMÕES-LOPES, P. C. **Interaction of coastal population of *Tursiops truncatus* (Cetacea, delphinidae) with the mullet artisanal fisheries in southern Brazil** Biotemas, 1991.

SIMÕES-LOPES, P. C.; FABIÁN, M. E. Residence patterns and site fidelity in bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus* (Montagu)(Cetacea, Delphinidae) off Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 4, p. 1017–1024, 1999.

SIMÕES-LOPES, P. C.; FABIÁN, M. E.; MENEGHETI, J. O. Dolphin interactions with the mullet artisanal fishing on Southern Brazil: a qualitative and quantitative approach. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 3, p. 709–726, 1998.

SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE RECURSOS HÍDRICOS DE SANTA CATARINA. **3.1 USO DO SOLO E COBERTURA VEGETAL.**

Disponível

em:

<[http://www.aguas.sc.gov.br/jsmallfib\\_top/DHRI/Planos de Bacias/Plano de Bacia Hidrografica do Rio Tubarao e Complexo Lagunar/Volume I/3-1.pdf](http://www.aguas.sc.gov.br/jsmallfib_top/DHRI/Planos%20de%20Bacias/Plano%20de%20Bacia%20Hidrografica%20do%20Rio%20Tubarao%20e%20Complexo%20Lagunar/Volume%20I/3-1.pdf)>. Acesso em: 12 jan. 2016.

SOUZA, P. P. DE. **AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM OSTRAS *Crassostrea brasiliana* MANTIDAS EM DIFERENTES LOCAIS DO SISTEMA ESTUARINO DE LAGUNA , SC , DURANTE O INVERNO *Crassostrea brasiliana* MANTIDAS EM DIFERENTES LOCAIS DO SISTEMA ESTUARINO DE LAGUNA , SC , DURANT.** [s.l.] Universidade Estadual de Santa Catarina, 2015.

SPINSANTI, G. et al. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies. **BMC molecular biology**, v. 7, p. 32, 2006.

STOCKIN, K. A. et al. Trace elements, PCBs and organochlorine

pesticides in New Zealand common dolphins (*Delphinus* sp.). **Science of the Total Environment**, v. 387, n. 1–3, p. 333–345, 2007.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are Biomarkers? **Curr Opin HIV AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, 2011.

SUN, J. et al. Levels and distribution of Dechlorane Plus and related compounds in surficial sediments of the Qiantang River in eastern China: The results of urbanization and tide. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 194–199, 2013.

SUNNUCKS, P.; HALES, D. F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular biology and evolution**, v. 13, n. 3, p. 510–524, 1996.

TABUCHI, M. et al. PCB-related alteration of thyroid hormones and thyroid hormone receptor gene expression in free-ranging harbor seals (*Phoca vitulina*). **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 7, p. 1024–1031, 2006.

TANABE, S. et al. Capacity and mode of PCB metabolism in small cetaceans. **Marine Mammal Science**, v. 4, n. 2, p. 103–124, 1988.

TANABE, S. et al. Persistent organochlorine residues in dolphins from the bay of Bengal, South India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, n. 6, p. 311–316, 1993.

TANABE, S.; IWATA, H.; TATSUKAWA, R. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. **Science of the Total Environment**, v. 154, n. 2–3, p. 163–177, 1994.

TANIGUCHI, S. Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do estado do Rio de Janeiro. p. 180, 2001.

TOHYAMA, C. et al. The relationship of the increased level of metallothionein with heavy metal levels in the tissue of the harbor seal (*Phoca vitulina*). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 12, n. 1, p. 85–94, 1986.

TORNERO, V. et al. Organochlorine contaminant and retinoid levels in blubber of common dolphins (*Delphinus delphis*) off northwestern Spain. **Environmental Pollution**, v. 140, n. 2, p. 312–321, 2006.

UNEP/FAO/IOC/IAEA. **Determination of DDT's and PCB's by capillary gas chromatography and electron capture detection** Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 40. [s.l: s.n.].

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, 2003.

VAN DOLAH, F. M. et al. Seasonal variation in the skin transcriptome of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the

northern Gulf of Mexico. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–21, 2015.

VERMA, A. S.; SHAPIRO, B. H. Sex-dependent expression of seven housekeeping genes in rat liver. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 21, n. 6, p. 1004–1008, 2006.

VETTER, W. Environmental occurrence of Q1, a C<sub>9</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>7</sub>N<sub>2</sub> compound, that has been identified as a natural bioaccumulative organochlorine. **Chemosphere**, v. 46, n. 9–10, p. 1477–1483, 2002.

VIEIRA, D. C. et al. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. **Chemosphere**, v. 162, p. 48–54, 2016.

WALKER, C. H. Biochemical biomarkers in ecotoxicology - Some recent developments. **Science of the Total Environment**, v. 171, n. 1–3, p. 189–195, 1995.

WAN, Q.; WHANG, I.; LEE, J. Molecular characterization of mu class glutathione-S-transferase from disk abalone (*Haliotis discus discus*), a potential biomarker of endocrine-disrupting chemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 2, p. 187–199, 2008.

WANIA, F.; MACKAY, D. Tracking the distribution of persistent organic pollutants: Control Strategies for these contaminants will require a better understanding of how they move around the globe. **Environmental science & technology**, v. 30, n. 9, p. 390–396, 1996.

WELLS, R. et al. Bottlenose Dolphins as Marine Ecosystem Sentinels: Developing a Health Monitoring System. **EcoHealth**, v. 1, n. 3, p. 246–254, 2004.

WHO. **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles**, 1993.

WILSON, R. M. et al. Spatial distribution of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inferred from stable isotopes and priority organic pollutants. **Science of the Total Environment**, v. 425, p. 223–230, 2012.

WINN, H. E.; BISCHOFF, W. L.; TARUSKI, A. G. Cytological sexing of cetacea. **Marine Biology**, v. 23, n. 4, p. 343–346, 1973.

WU, P. J. et al. Immunological, Hematological, and Biochemical Responses in Immature White-footed Mice Following Maternal Aroclor 1254 Exposure: A possible Bioindicator. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 36, n. 1999, p. 469–476, 1999.

WÜRSIG, B.; JEFFERSON, T. A. **Methods of photo-identification for small cetaceans** Report of the International Whaling Commission, 1990. Disponível em:  
<[http://swfsc.noaa.gov/uploadedFiles/Divisions/PRD/Publications/Wursig\\_Jefferson1990\(5\).pdf](http://swfsc.noaa.gov/uploadedFiles/Divisions/PRD/Publications/Wursig_Jefferson1990(5).pdf)>

YOGUI, G. T. et al. Levels of persistent organic pollutants and residual pattern of DDTs in small cetaceans from the coast of São Paulo,

Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 10, p. 1862–1867, 2010.

YOGUI, G. T. et al. PBDEs in the blubber of marine mammals from coastal areas of São Paulo, Brazil, southwestern Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 2666–2670, 2011.

YOGUI, G. T.; DE OLIVEIRA SANTOS, M. C.; MONTONE, R. C. Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananéia estuary, southeastern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 312, n. 1–3, p. 67–78, 2003.

YU, S.; HALBROOK, R. S.; SPARLING, D. W. Accumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and evaluation of hematological and immunological effects of PCB exposure on turtles. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 6, p. 823–827, 2012.

ZANETTE, J. et al. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 1, p. 196–198, 2008.

ZHANG, L. et al. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 517–527, 2012.

ZHOU, H. et al. Molecular phylogenies and evolutionary behavior of AhR (aryl hydrocarbon receptor) pathway genes in aquatic animals: Implications for the toxicology mechanism of some persistent organic pollutants (POPs). **Chemosphere**, v. 78, n. 2, p. 193–205, 2010.

ZUUR, A. F.; IENO, E. N.; ELPHICK, C. S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 3–14, 2010.